



Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento
2009

**Ana Cristina
Antunes Ferreira**

**Avaliação da sensibilidade de espécies não alvo a
três princípios activos de pesticidas**



**Ana Cristina
Antunes Ferreira**

**Avaliação da sensibilidade de espécies não alvo a
três princípios activos de pesticidas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde e Risco Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora do CESAM -Universidade de Aveiro e sob a co-orientação da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais por todo o apoio prestado desde sempre!
e a todos aqueles que acreditaram em mim.....

o júri

presidente

Doutor Carlos Alberto Diogo Soares Borrego
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno José Fernandes de Jesus Silva Nunes
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade
Fernando Pessoa

Doutora Joana Luísa Estevinho Pereira
Estagiária de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira (Orientadora)
Investigadora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Sara Cristina Ferreira Antunes (Co-Orientadora)
Estagiária de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves, por me ter aceitado na sua equipa de trabalho e proporcionar todas as condições necessárias para a prossecução da presente dissertação.

À Doutora Ruth Pereira, por me ter proporcionado a realização do presente trabalho e pelo grande apoio prestado na concretização da dissertação.

À Doutora Sara Antunes, pelos ensinamentos transmitidos, pelas críticas, pelas sugestões e pelo apoio ao longo de todo o trabalho.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda e companheirismo. Em especial, à Doutora Joana Pereira por mostrar sempre disponibilidade, vontade de ajudar e boa disposição.

À Paula, por continuares a mesma amiga de sempre. Insistimos em procurar e partilhar desafios, alguns deles nada fáceis, mas são estes que fortalecem a nossa amizade. A tua capacidade para ouvires todos os meus desabafos não foi superada por ninguém, foste a maior! A tua força e vontade de vencer contrariaram os meus momentos de fraqueza e encorajaram-me para seguir até ao fim.....Muito Obrigada!

Aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida. Sem eles, mais uma vez, não teria sido possível ultrapassar esta meta. Toda a força e o carinho transmitidos, muitas vezes em silêncio, foram e serão as melhores armas da minha vida. Obrigada por tudo!

Ao Ni, obrigada por me ajudares a superar todos os momentos de *stress*. A tua compreensão e força fortaleceram e impediram algum deslizamento ao longo do trabalho. Todos os instantes partilhados contigo foram e continuarão a ser importantes na minha vida. Sinto-me feliz por fazeres parte da minha vida. Obrigada!

Ao mano Rafael, por estar sempre disponível, mesmo estando longe, para me apoiar.

Aos meus amigos, a todos aqueles que directamente ou indirectamente me ajudaram, ouviram e me transmitiram força para atingir o fim deste trabalho.

Ao Município de Alcobaça, por me ter permitido concretizar este trabalho.

palavras-chave

Metomil, Propanil, Glifosato, *D. magna*, *P. subcapitata*, *E. andrei*, CE₅₀, Toxicidade, enzima Acetilcolinesterase

resumo

Em Portugal, tal como no resto dos países da União Europeia, a necessidade de um aumento qualitativo e quantitativo da produção agrícola tem estimulado um incremento significativo na utilização de pesticidas. Os pesticidas são agentes químicos especificamente desenhados com a intenção de inibir a actividade biológica de organismos prejudiciais às colheitas agrícolas, no entanto, podem provocar também efeitos nefastos sobre organismos não alvo. A Directiva 414/91/CEE recomenda a realização de testes ecotoxicológicos com espécies não alvo para avaliação do risco ecológico de novos pesticidas colocados no mercado. Assim, o objectivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos de três princípios activos de pesticidas (metomil, propanil e glifosato) sobre organismos não alvo (*Eisenia andrei*, *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata*) dos compartimentos terrestre e aquático, respectivamente. Para tal, foram realizados testes agudos, seguindo protocolos padronizados, para a determinação de valores de CE₅₀. A avaliação ecotoxicológica dos princípios activos dos pesticidas permite aumentar a informação ecotoxicológica passível de ser integrada numa análise de risco preditiva, utilizando diferentes metodologias, entre as quais se destaca a construção de curvas de distribuição de sensibilidade das espécies, para determinação de doses limiares protectoras de todo o ecossistema. Os resultados obtidos demonstraram que *P. subcapitata* apresentou elevada sensibilidade ao princípio activo propanil (CE₅₀= 0,031 mg L⁻¹), enquanto que *D. magna* revelou maior sensibilidade ao princípio activo metomil (CE₅₀=0,021 mg L⁻¹). Relativamente ao compartimento terrestre, *E. andrei* apenas evitou de forma significativa solos contaminados com concentrações de metomil iguais ou superiores a 1,02 Kg ha⁻¹. Em complementaridade à obtenção destes dados, e para o princípio activo metomil foram ainda realizados testes de evitamento com *E. andrei*, em paralelo com a medição da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), nos organismos expostos à gama dde uma relação entre os efeitos comportamentais (*resposta net*) e respostas bioquímicas (inibição enzimática). A enzima AChE sofreu uma inibição significativa nos organismos expostos a todas as concentrações de metomil testadas. Esta inibição enzimática pode ter estado relacionada com a redução da capacidade de *Eisenia andrei*, de evitar o solo contaminado com a concentração mais elevada de metomil. Este facto, requer confirmação pois pode reduzir a sensibilidade deste ensaio para pesticidas com modo de acção semelhante aos carbamatos e compostos organofosfatos.

keywords

Methomyl, Propanil, Glyphosate, *D. magna*, *P. subcapitata*, *E. andrei*, EC₅₀, Toxicity, Acetylcholinesterase enzyme

abstract

In Portugal, as well as in other European Union countries, the efforts for increasing the quality and quantity of agricultural production have raised the use. Pesticides are chemical agents specifically designed to prevent the biological activity of organisms with harmful impact on crops. However, they can also provoke negative effects on non-target organisms. Directive 414/91/CEE recommends the development of ecotoxicological studies on non-target species, when addressing the effects of a new pesticide that appears in the market. Thus, the aim of the current study was to assess the toxicological effects of three active ingredients of pesticides (methomyl, propanil and glyphosate) on non-target organisms from the terrestrial and aquatic compartment (*Eisenia andrei*, *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*). In order to do so, acute tests were carried out to determine the EC₅₀ values for each compound and species. This provides additional ecotoxicological information, suitable for integration in a predictive risk assessment, following different methodologies, such as the integration in species sensitivity distribution curves (SSD curves) aimed to derive threshold levels for the application of pesticides. The results obtained indicated that *P. subcapitata* presented a higher sensitivity to propanil (EC₅₀ = 0.031 mg L⁻¹), while *D. magna* revealed a higher sensitivity to methomyl (EC₅₀ = 0.021 mg L⁻¹). In what concerns to the terrestrial compartment, *E. andrei* only showed a significant avoidance behaviour when exposed to soils contaminated with methomyl concentrations equal or above 1.02 Kg ha⁻¹. Additionally, an avoidance assay with *E. andrei* was carried out, in parallel with the evaluation of acetylcholinesterase activity (AChE) on organisms exposed to the same concentrations tested in the avoidance assay. These assays were aimed in finding a relationship between the effects on behavior (avoidance of contaminated soil) and on biochemical biomarkers (inhibition of the acetylcholinesterase enzyme), caused by methomyl. The inhibition of AChE may have been responsible by the reduced ability of earthworms related with methomyl, an aspect that may reduce the sensitivity of the avoidance assay for the screening ecotoxicological evaluation of pesticides.

*Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem
concentração e auto sacrifício, esforço e dúvida.*

(Max Beerbohm)

ÍNDICE

	Pág.
Introdução Geral	3
Pesticidas xenobióticos capazes de afectar diferentes compartimentos ambientais - solo e água	4
Avaliação de risco ecológico	10
Caracterização dos princípios activos utilizados	12
Insecticida Metomil	14
Herbicida Propanil	16
Herbicida Glifosato	18
Biomarcadores	20
Objectivos da dissertação	22
Estrutura da dissertação	22
Referências bibliográficas	23
<hr/>	
Capítulo I Avaliação da toxicidade de três princípios activos de pesticidas largamente utilizados em Portugal, em organismos não alvo	33
Resumo	33
Introdução	34
Material e Métodos	36
Organismos teste	36
Químicos testados	41
Testes ecotoxicológicos	43
Resultados	48
Discussão	52
Agradecimentos	57
Referências bibliográficas	58
<hr/>	
Capítulo II Evitamento de <i>Eisenia andrei</i>: resposta comportamental versus bioquímica	65
Resumo	65
Introdução	66
Material e Métodos	68
Cultura dos organismos	68
Testes ecotoxicológicos	68
Resultados	71
Discussão	72
Agradecimentos	74
Referências bibliográficas	75
Considerações Finais	81

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A entrada contínua, no Ambiente, de pesticidas de origem antropogénica resulta num permanente risco ecológico a que os ecossistemas terrestres e aquáticos estão sujeitos. Em Portugal, tal como no resto dos países da União Europeia, o uso de pesticidas, tais como herbicidas, insecticidas e fungicidas, é um processo corrente que visa aumentar a produtividade agrícola e/ou proteger as culturas das pragas e outros agentes prejudiciais (Pereira e Gonçalves, 2007). Os pesticidas são tóxicos aplicados intencionalmente para combater pragas agrícolas, no entanto, podem, potencialmente, afectar outras espécies, causando efeitos nefastos graves em organismos não alvos. A presença de um xenobiótico num compartimento ambiental não indica, por si só, que este último sofra efeitos adversos. Em oposição, as baixas concentrações ambientais de xenobióticos não são necessariamente inócuas, uma vez que podem desencadear um conjunto de efeitos crónicos, quer pela sua acção individual ou combinada, que podem acabar por comprometer a sustentabilidade das populações naturais. Como tal, os programas de monitorização, onde se efectuem avaliações de parâmetros ambientais de modo regular, não devem ser somente baseados em análises químicas, uma vez que estas não fornecem indicações sobre eventuais efeitos nefastos sobre o biota (Peakall, 1992; Connell *et al.*, 1999). As análises químicas fornecem apenas informação sobre as concentrações dos contaminantes num determinado sistema, isto é sobre o nível de exposição a que os organismos potencialmente estarão sujeitos, sem sequer ser possível inferir sobre a real biodisponibilidade dos mesmos, uma vez que não existem métodos de extracção capazes de simular as condições ambientais em que os mesmos ocorrem. O estabelecimento de relações entre os níveis do contaminante e a avaliação efectiva dos seus efeitos nos sistemas biológicos deverá, portanto, ser parte integrante de programas de monitorização da poluição ambiental (Peakall, 1992; Van der Oost *et al.*, 2003), que deste modo deverão ser substituídos por processos de avaliação de riscos. O consistente aumento na quantidade de pesticidas aplicados na agricultura e/ou o potencial tóxico das novas formulações deve ser encarado como um problema para organismos não alvo dos compartimentos aquático e terrestre. As políticas de protecção ambiental recomendam que seja feita uma análise de risco extensiva ao nível ambiental, como condição fundamental para a colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado (CE, 1991). A avaliação ecotoxicológica destes produtos, utilizando organismos não alvo

padronizados, pode ser utilizada para perceber os seus efeitos letais e sub-letais ao nível do indivíduo e fornecer informação relevante acerca do seu potencial para afectar os ecossistemas, constituindo ainda informação preliminar para análises mais complexas.

1. Pesticidas: xenobióticos capazes de afectar diferentes compartimentos ambientais - solo e água

Segundo a União Europeia (CE, 1991), o termo pesticida - produto fitofarmacêutico - é definido como *qualquer substância activa ou preparação (conjunto de uma ou mais substâncias activas) que se destine a prevenir, repelir ou matar os organismos potencialmente prejudiciais aos vegetais ou produtos vegetais de forma a assegurar a sua conservação*. Esta definição bastante abrangente é adoptada pela Directiva 91/414/CEE (CE, 1991) e assim foi transposta para a legislação nacional - Decreto-Lei n.º 94/98 de 15 de Abril (Conselho de Ministros de 12 de Fevereiro de 1998), que adopta as normas técnicas de execução, referentes à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Numa perspectiva mais prática e simplista, os pesticidas são, assim, produtos químicos que são concebidos para interferir com processos fundamentais dos organismos vivos, podendo, por isso, ser capazes de matar ou inibir a actividade biológica de organismos nocivos à produção agrícola (e.g. pragas). Os pesticidas podem ter várias designações, consoante o organismo alvo que se pretende combater: herbicidas (no caso das plantas), insecticidas (no caso dos insectos), fungicidas (no caso dos fungos). A(s) substância(s) activa(s) que os compõem são responsáveis pela sua acção química sobre os organismos alvo. Além da(s) substância(s) activa(s), o pesticida tem ainda na sua composição um conjunto variável de outras substâncias denominadas adjuvantes. Em teoria, estes não interferem química ou biologicamente com a substância activa, no entanto, fornecem determinadas características e propriedades fundamentais ao “pesticida” (e.g. mobilidade, estabilidade química e especificidade na aplicação - solubilidade, capacidade de suspensão, poder absorvente, viscosidade) (Amaro, 2003; Green, 2000).

A utilização de pesticidas apresenta vantagens económicas consideráveis. Os agricultores utilizam-nos para melhorar ou manter os rendimentos, eliminando ou reduzindo a concorrência de ervas daninhas, de ataques de pragas e para limitar a mão-de-obra necessária. Os pesticidas desempenham igualmente um papel essencial, na medida em

que garantem fornecimentos anuais fiáveis de produtos agrícolas a preços sustentáveis, que os tornam acessíveis a todos os consumidores. Os pesticidas podem ainda proteger o gado de pasto contra doenças e até contribuir, numa perspectiva mais antropocêntrica para controlar vectores de algumas doenças epidémicas (Carvalho, 2006).

A União Europeia representa um quarto do Mercado Mundial de pesticidas de uso agrícola, com uma dinâmica de comercialização de aproximadamente 330000 toneladas de pesticidas por ano (CEC, 2002), dos quais 45% são fungicidas, 34% herbicidas e 8% insecticidas (EUROSTAT: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>; acesso em Maio de 2009). As décadas de 1960, 1970 e 1980 foram pródigas no surgimento de pesticidas oriundos de múltiplas famílias químicas, devido à necessidade de aumentar a produção agrícola em termos quantitativos e qualitativos. Até ao fim dos anos 90 foi registado um aumento significativo nas vendas de pesticidas (herbicidas, insecticidas e fungicidas), sendo que, a partir daí se tem observado um ligeiro decréscimo, atribuído fundamentalmente ao esforço dos países constituintes da Europa dos 15 (CE, 2007). Apesar desta ligeira diminuição de vendas na União Europeia, no ano de 1995, foram comercializadas 279811 toneladas de substâncias activas constituintes de pesticidas, sendo que, em 2001, esse valor ascendeu para 327642 toneladas. (EUROSTAT: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>; acesso em Maio de 2009). A tendência nacional de vendas de pesticidas em Portugal é idêntica, isto é, embora seja assumido um progressivo declínio nas vendas dos últimos anos, não há sinais incontestáveis de retorno aos valores da década passada: em 1995 foram vendidas 11818 toneladas enquanto que em 2007 se comercializaram 16689 toneladas de substâncias activas constituintes de pesticidas (EUROSTAT: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>; acesso em Maio de 2009). Com base nos dados relativos aos pesticidas comercializados em Portugal, publicitados pela Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, entre os anos de 2005 e 2006, houve um decréscimo na ordem dos 4,1% nos quantitativos vendidos das substâncias activas dos pesticidas. Entre os anos de 2006 e 2007, registou-se um aumento de 6,3% nas vendas. De facto, o decréscimo nas vendas é essencialmente atribuído ao desenvolvimento de novos compostos, desenhados de forma a diminuir a dosagem necessária, e não à diminuição efectiva da utilização de pesticidas para a protecção das culturas agrícolas (CE, 2007).

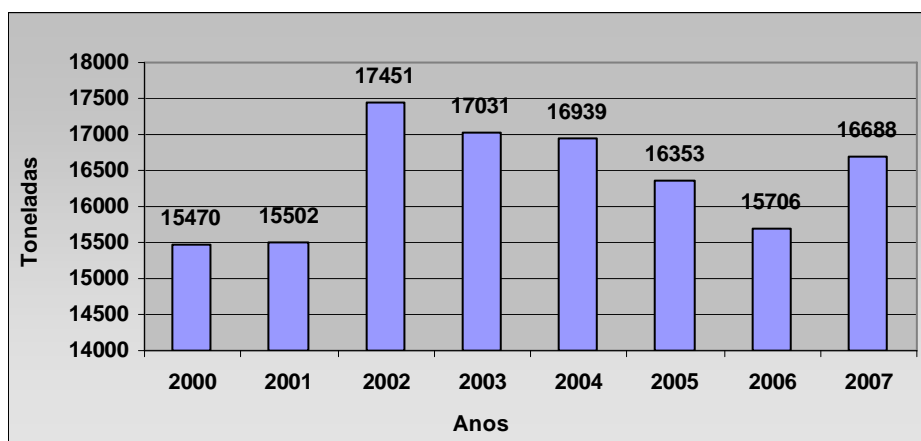


Figura 1. Valores dos quantitativos de substâncias activas vendidas em Portugal entre os anos de 2000 e 2007 (Relatórios da D.G.A.D.R. de 2001 a 2008).

A União Europeia reconheceu a importância da utilização dos pesticidas para melhorar a produção agrícola (CE, 2005). A protecção da saúde humana, relativamente à utilização de pesticidas, a nível europeu, é assegurada pela Directiva 98/83/CE (CE, 1998) que estabelece os valores limite de pesticidas para a água de consumo humano e pelo Regulamento nº 396/2005 (CE, 2005) que fixa os limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para os animais, de origem vegetal ou animal. As primeiras preocupações com a protecção do ambiente em relação ao uso de pesticidas são assumidas mais recentemente na Directiva 91/414/CEE (CE, 1991). Esta directiva visa limitar os riscos na origem, recomendando, para o efeito, a realização de uma avaliação preditiva de riscos, exaustiva, para cada substância activa aplicada quer para a população humana quer para o ambiente, antes da sua colocação no mercado poder ser autorizada. Um pesticida só é autorizado se houver demonstração de que, em condições normais de utilização, esse mesmo produto não produz efeitos nefastos na saúde humana ou animal e no ambiente. Na sequência dessa Directiva foram publicados vários documentos, entre os quais, documentos com linhas orientadoras relativas à ecotoxicologia terrestre (CE, 2002a) e à ecotoxicologia aquática (CE, 2002b). Estes manifestam claramente o reconhecimento da importância da protecção dos ecossistemas, a nível comunitário, como um processo associado à regulamentação da comercialização e uso de pesticidas para melhorar a produção agrícola. Posteriormente, foi publicado o Regulamento 1907/2006, um normativo sobre o registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH) no contexto europeu (CE, 2006). Este

esforço de regulação por parte da União Europeia reside no reconhecimento do facto de os pesticidas poderem não ser ambientalmente inócuos. Um pesticida “ideal” apenas deveria afectar as espécies alvo e, de seguida, degradar-se imediatamente em substâncias não tóxicas (Nimmo e McEwen, 1994; Waldron, 1997). No entanto, verifica-se que, após a sua aplicação, os pesticidas persistem no ambiente e apresentam um comportamento ambiental complexo resultante de vários processos físicos, químicos e biológicos que determinam o seu transporte ambiental e eventual transformação.

A grande quantidade de pesticidas utilizada na agricultura pode ser considerada uma das maiores ameaças aos solos, bem como às águas superficiais e subterrâneas. A diluição e a dispersão dos pesticidas, assim como a sua biodisponibilidade para organismos não alvo aquático e terrestres, dependem da formulação dos produtos, das propriedades das substâncias activas (e.g. solubilidade, pressão de vapor), da dose aplicada e modo de aplicação, das condições climáticas (pluviosidade, intensidade do vento, temperatura), do tipo de cultura e de solo e ainda das características da massa de água (e.g. velocidade da corrente, presença de vegetação e tipo de sedimento). A maior parte dos pesticidas aplicados recai sobre o solo, durante ou após o tratamento (Jamet, 1994). O solo é contaminado, directa ou indirectamente, pela aplicação do químico nas culturas ou através da queda das folhas tratadas e ainda pela movimentação da água à superfície do solo e ao longo do seu perfil. O solo tem a capacidade de reter e concentrar substâncias químicas, o que o torna altamente vulnerável à presença de contaminantes. Esta acumulação pode ser mais significativa neste compartimento (terrestre) do que no compartimento aquático (O'Halloran, 2006). Segundo vários autores (e.g. Brown *et al.*, 1995; Flury, 1996) os processos de transporte que mais contribuem para os pesticidas contaminarem o solo e a água são a aspersão, a volatilização, a lixiviação, as escorrências de águas superficiais e a drenagem (*vide* figura 2). Durante a aplicação de um pesticida por aspersão, parte distribui-se pelo compartimento ar, podendo posteriormente ser arrastado pelo vento para fora da área que se pretende tratar (solo e/ou água). A volatilização é responsável pela distribuição do pesticida da superfície do solo ou da água para a atmosfera. Este processo pode ainda ocorrer a partir da superfície foliar das plantas. Os pesticidas presentes na atmosfera poderão ser novamente depositados à superfície do solo e da água, por via húmida (e.g. através da chuva) ou seca (e.g. pelo vento). O transporte atmosférico constitui uma pequena parcela da contaminação de massas de água superficiais por pesticidas (Kanwar,

1996). A lixiviação/percolação é um outro processo possível de transporte dos pesticidas, ao longo do perfil do solo, directamente para as águas subterrâneas, que depende da solubilidade das moléculas químicas na água, da textura e estrutura do solo e das condições climáticas no momento em que é feita a sua aplicação. A movimentação dos pesticidas através da superfície do solo, geralmente facilitada pelas escorrências da água da chuva, é considerada a principal via de contaminação das águas superficiais (Flury, 1996). A concentração do pesticida e a distância a que ele é transportado dependem de factores tais como: taxa de aplicação, propriedades físico-químicas do pesticida e do solo, condições meteorológicas, topografia do terreno e o tipo de coberto vegetal (Leonard, 1990). Os canais de drenagem que permitem remover a água em excesso dos terrenos agrícolas podem também ser considerados uma via de transporte oportunista dos pesticidas para o compartimento aquático.

Os pesticidas são frequentemente detectados nas massas de água superficiais e subterrâneas, podendo mesmo ser considerados uma das maiores ameaças aos ecossistemas aquáticos (Loague *et al.*, 1998). Os recursos hídricos actuam como integradores dos processos biogeoquímicos em regiões agrícolas. Sendo assim, quando os pesticidas são aplicados, particularmente na agricultura, os recursos hídricos, superficiais ou subterrâneos, são os principais destinos finais destes químicos.

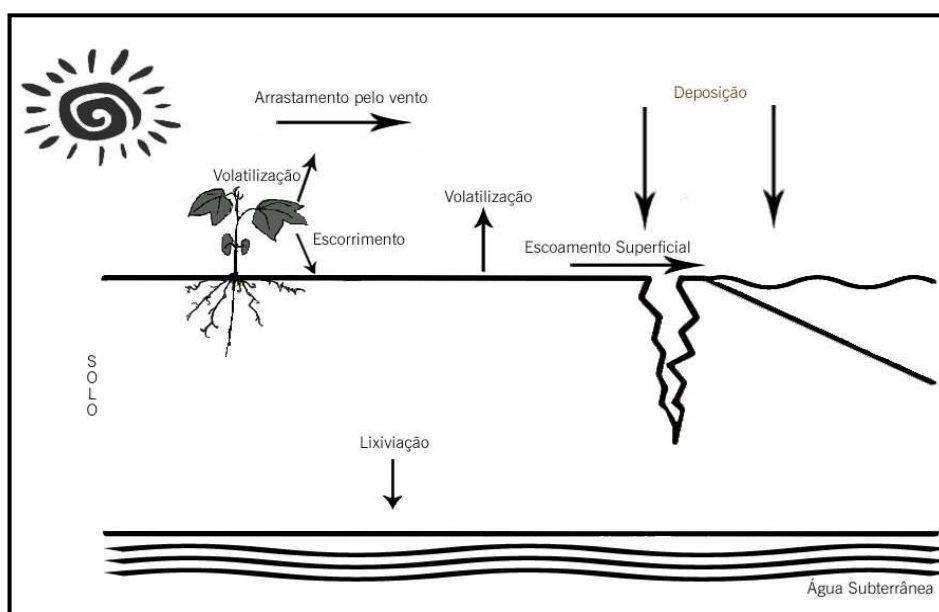


Figura 2. Representação esquemática dos processos de transporte e mobilidade dos pesticidas ao longo da interface dos compartimentos terrestre e aquático. *Adaptado de Weber e Miller, 1989.*

Em condições normais, é importante salientar que pode ser significativa a quantidade de pesticida que se movimenta e se perde nos vários compartimentos ambientais, não atingindo a espécie alvo (Sabik *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2007). Na evidência do aumento do uso de pesticidas, a comunidade científica, assim como as entidades decisoras e reguladoras têm demonstrado uma crescente preocupação com os riscos associados à sua utilização, com o controlo e melhoramento das práticas agrícolas e ainda com as técnicas de minimização dos efeitos da poluição difusa dos químicos utilizados na produção agrícola (Castro *et al.*, 2005; Loague *et al.*, 1998). Nesta linha de conduta, foi promulgada legislação mais rigorosa sobre o uso de alguns pesticidas e a proibição de outros (Decreto-Lei n.º94/98 de 15 de Abril, Decreto-Lei nº173/2005 de 21 de Outubro). De forma a banir os pesticidas mais antigos e sem alvo definido, as empresas que dominam o mercado dos pesticidas investiram em novos produtos, os pesticidas ditos “contemporâneos”. Estes pesticidas apresentam valores mais baixos de toxicidade pelo facto de serem menos persistentes no ambiente, mais selectivos quanto ao modo de acção, não tendo tendência a ser bioacumulados e serem passíveis de ser metabolizados e excretados por vários organismos não alvo que possam ser atingidos pelo químico (Barr e Needham, 2002). São considerados pesticidas contemporâneos as seguintes classes de pesticidas: organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas e acetanilidas (Pereira, 2008).

Têm sido vários os estudos, a nível mundial, que demonstram que é significativa a quantidade de pesticidas persistentes e pesticidas contemporâneos que atinge o compartimento aquático (Golfenopoulos *et al.*, 2003; Guest *et al.*, 2006; Brack *et al.*, 2007). Em Portugal, os estudos não são muito numerosos, no entanto, têm sido detectados diversos pesticidas acima dos limites impostos na lei, em vários tipos de massas de água subterrâneas e superficiais (Tauler *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2002; Cerejeira *et al.*, 2003). O reconhecimento da importância do solo e do nível de degradação que este recurso natural já sofreu, em várias partes do mundo, levou a que, só mais recentemente, tenham sido desenvolvidos estudos para avaliar o estado de conservação e a qualidade do solo, os quais são bem mais escassos quando comparados com os estudos existentes para os compartimentos aquático e atmosférico (Beck e Römcke, 2005).

De acordo com o que foi já referido, as análises químicas são um passo fundamental na avaliação do nível de contaminação de um ecossistema e podem contribuir

para a protecção dos mesmos, no entanto, não permitem obter informação sobre os efeitos adversos da exposição de um pesticida nas comunidades bióticas. É neste contexto que surge o desenvolvimento de esquemas de análise de risco ecológico e de recomendações e normas para a autorização de colocação de pesticidas no mercado comum da União Europeia (CE, 1991; CE, 2002a; CE, 2002b). As Directivas 93/67/CEE (CE, 1993) e 98/8/CEE (CE, 1998) e o Regulamento 1488/94 (CE, 1994) requerem que seja efectuada uma avaliação de risco ecológico para as novas substâncias químicas desenvolvidas, antes da sua colocação no mercado, bem como para princípios activos de pesticidas já em circulação no mercado, de forma a discriminar os efeitos destes contaminantes nos vários compartimentos do biota. Logo, numa avaliação do risco ecológico deste tipo de contaminantes, torna-se fundamental considerar a avaliação dos seus efeitos deletérios em organismos não alvo, representativos dos vários compartimentos ambientais (essencialmente para o aquático e o terrestre). Nos Regulamentos 793/93 (CE, 1993a) e 1488/94 (CE, 1994) são apresentados esquemas de avaliação de risco para os grupos de organismos aquáticos e terrestres. De acordo com o artigo 9º do Regulamento 793/93 (CE, 1993a), o mínimo de dados necessários à validação da comercialização e utilização de substâncias existentes, será o resultado da bateria de testes ecotoxicológicos de base para as novas substâncias já referenciadas no Anexo VII da Directiva 67/548/CEE. Em resumo, estas exigências mínimas permitem assegurar a disponibilidade de dados sobre o efeito tóxico dos compostos tóxicos em vários organismos, incluindo os abordados neste estudo (cladóceros, algas e minhocas).

2. Avaliação de risco ecológico

A avaliação de risco ecológico (ARE) é a metodologia utilizada para estimar os efeitos adversos que podem ocorrer ou que já estão em curso, em comunidades naturais, em locais expostos a agentes físicos, químicos ou biológicos (Suter, 1993; USEPA, 1998; Solomon e Sibley, 2002). Existem duas categorias gerais de avaliação de risco ecológico: a avaliação retrospectiva e avaliação preditiva (Newman, 2003). A avaliação de risco ecológico preditiva desenvolve-se a partir de uma situação previamente planeada ou proposta, isto é, começa com a origem da proposta de um novo químico e prossegue para estimar os riscos dos efeitos deste químico no ambiente. Este tipo de avaliação tem

assumido maior importância dado que começou a ser exigida para guiar a regulamentação de novas substâncias químicas, de substâncias prioritárias já existentes, substâncias activas e substâncias perigosas em produtos biocidas [(Directiva 93/67/CEE (CE,1993)] e Regulamento 1488/94 (CE,1994)). A avaliação retrospectiva, nos últimos anos, tem sido cada vez mais relevante, devido ao reconhecimento da existência de inúmeros locais contaminados em todo o mundo. Assim, a avaliação do risco retrospectiva baseia-se numa condição pré-existente, isto é, são avaliados os efeitos da contaminação existentes que podem estar a ter, ou vir a ter consequências ecológicas futuras irreversíveis, tais como: deposição de resíduos perigosos, lamas, chuvas ácidas, extracção de minérios ou aplicação indiscriminada de pesticidas (e.g. Antunes *et al.*, 2007).

A avaliação de risco preditiva angaria informação para cenários de contaminação, genéricos ou hipotéticos, enquanto que a avaliação de risco retrospectiva tem um palco de actuação concreto, definido pela presença dos contaminantes e/ou registo de efeitos adversos (Suter, 1993). Toda a avaliação preditiva se baseia em informação sobre fontes e taxas de emissão e procede à estimativa dos efeitos esperados, analisando e integrando os impactos toxicológicos/ecotoxicológicos que as substâncias químicas podem ter nos diferentes receptores ecológicos, antes de serem libertadas para o meio ambiente e procedendo ao cálculo dos riscos associados a actividades futuras (Suter, 1993). A avaliação de risco ecológico preditiva e retrospectiva, de acordo com os primeiros modelos conceptuais desenvolvidos, caracterizam-se por quatro etapas: 1) identificação dos perigos; 2) avaliação da exposição; 3) avaliação dos efeitos ecológicos; 4) caracterização do risco (Suter, 1993; USEPA, 1998; Newman, 2003). A primeira fase consiste no levantamento de toda a informação referente à situação, a nível de: fontes e taxas de emissão, receptores ecológicos e poluentes de potencial preocupação. Estes últimos são identificados com base em relações dose-resposta existentes que comprovam a sua perigosidade e com base nas concentrações presentes ou previstas nos diferentes compartimentos ambientais. Na avaliação da exposição, são identificadas as fontes de contaminação, as vias de exposição, o tipo e a frequência de contacto dos receptores ecológicos com os contaminantes. A avaliação dos efeitos ecológicos consiste na obtenção de dados ecotoxicológicos relevantes para os níveis de exposição previstos ou na medição de efeitos já em curso, como resultado de exposições reais. A fase da caracterização do risco consiste na compilação da

informação das etapas anteriores para calcular a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos para o ecossistema.

No contexto da avaliação de risco ecológico, começam por se realizar testes ecotoxicológicos, que contemplam exposições, metodologicamente simples, rápidos, económicos, sendo por isso normalmente utilizados para um rastreio inicial da avaliação da toxicidade (“*sreening method*”). Estes testes fornecem prova directa da toxicidade relacionada com os contaminantes em causa e a sua verdadeira biodisponibilidade, os seus efeitos combinados e as vias de exposição mais significativas, assumindo contudo uma biodisponibilidade de 100%. Nesta fase a maioria dos testes é conduzida sob condições laboratoriais e não *in situ* (O’Halloran, 2006). Numa avaliação aguda letal, os organismos são expostos ao químico, disponível em concentrações relativamente elevadas durante um reduzido período de tempo. O grau de incerteza associado a este rastreio inicial é geralmente elevado, na medida em que as concentrações dos pesticidas testadas, geralmente não são ecologicamente relevantes, uma vez que são bastante superiores às concentrações aplicadas/existentes no meio ambiente. No contexto da utilização de testes ecotoxicológicos na avaliação de risco ecológico, é fundamental ter em conta o realismo das concentrações que se utilizam. Ou seja, deve ser considerada a informação existente acerca das concentrações ambientais do químico a testar e dos padrões de exposição à substância ocorrentes em condições naturais, para que os resultados da análise sejam ecologicamente relevantes. Os testes agudos letais abordam os efeitos letais dos contaminantes ao nível do indivíduo e constituem, por isso, plataformas de base, úteis e relativamente simplificadas, para estudos mais abrangentes a níveis funcionais de maior complexidade no ecossistema (e.g. população, comunidade). Contudo, não obstante as suas lacunas, a grande maioria da informação ecotoxicológica existente, passível de ser usada para a notificação de compostos químicos ou para avaliações de risco retrospectivas, são referentes a efeitos letais, o que aumenta o grau de incerteza das avaliações.

3. Caracterização dos princípios activos utilizados

No presente trabalho, foram utilizados três princípios activos de pesticidas orgânicos, classificados como dois herbicidas e um insecticida. O metomil (insecticida carbamato) com uma pureza de 99,5%, doado pela empresa Makhteshim Agan®, Portugal

e os herbicidas propanil e glifosato (anilida e aminoácido fosfatado) com níveis de pureza, respectivamente, de 97% e 95%, fornecidos pela empresa Sapec Agro®, Portugal. O critério de selecção destes pesticidas consiste na relevância que estes químicos têm na produção agrícola, em Portugal. Segundo a Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, no ano de 2007, o metomil correspondeu a 0,86% da venda total dos insecticidas e acaricidas, o glifosato e propanil, respectivamente, representaram 65,12% e 0,53% do total de herbicidas comercializados, em Portugal (Vieira, 2008). Nas figuras 3 e 4, encontram-se os valores dos quantitativos de substâncias activas do metomil, propanil e glifosato comercializados entre os anos de 2000 e 2007. Apesar de os pesticidas serem desenhados para combater as pragas agrícolas e assim contribuir para o aumento da produção agrícola, é reconhecido que há vários processos físicos (más condições de utilização, condições climatéricas, propriedades físicas e químicas das substâncias activas) que fomentam a interacção destes químicos, e a sua capacidade para gerar efeitos adversos nos compartimentos terrestre e aquático. Neste sentido, torna-se relevante apresentar uma breve caracterização dos princípios activos. Adicionalmente, para cada princípio activo, apresenta-se um resumo da informação ecotoxicológica disponível, quer na literatura científica relacionada quer em bases de dados de acesso livre na Internet, relativa à toxicidade aguda para espécies não alvo para os três pesticidas com os referidos princípios activos (*vide* tabelas 1, 2 e 3). A observação dos dados apresentados nas tabelas (1, 2 e 3) revela que a informação ecotoxicológica não é muito abundante e que na sua maioria é relativa a espécies aquáticas, neste caso particular *Daphnia magna*. O conjunto de dados disponibilizados nas tabelas restringe-se à informação encontrada e que foi considerada relevante, no contexto da avaliação da toxicidade aguda dos compostos acima mencionados e apenas para 3 organismos não alvo seleccionados, pertencentes a diferentes compartimentos ambientais (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Daphnia magna*; *Eisenia andrei*).

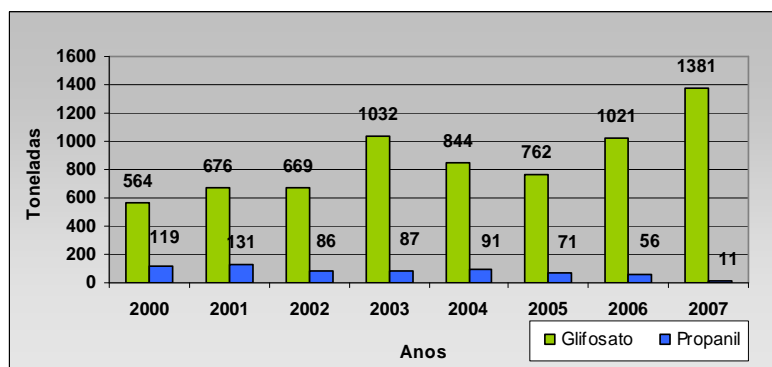


Figura 3. Valores dos quantitativos de substâncias activas de glifosato e propanil vendidas em Portugal entre os anos de 2000 e 2007 (relatórios da D.G.A.D.R. de 2001 a 2008).

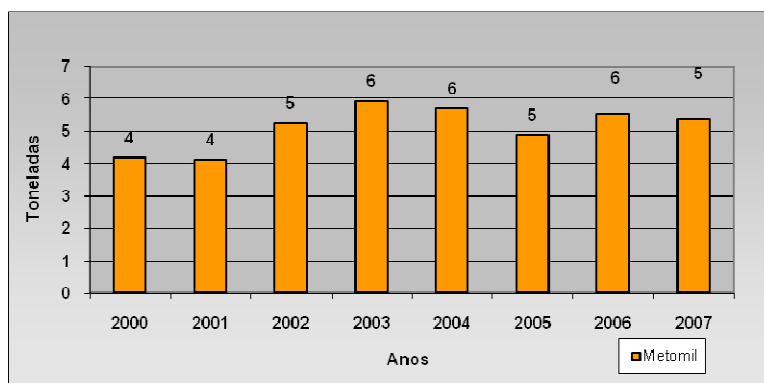


Figura 4. Valores dos quantitativos de substâncias activas de metomil vendidas em Portugal entre os anos de 2000 e 2007 (relatórios da D.G.A.D.R. de 2001 a 2008).

3.1. Insecticida Metomil

O insecticida Metomil pertence ao grupo químico dos carbamatos. Trata-se de um carbamato mono-metílico, um composto sintético reconhecido pela IUPAC (*International of Pure and applied Chemistry*) através da designação química de “S-metil N-(metilcarbamoiloxil) tioacetmidado” (*vide* Figura 5). Este insecticida é utilizado para controlar uma vasta gama de insectos, actuando por contacto directo ou ingestão (Tomlin, 2001). É usado em culturas do tipo hortaliças, mas também em árvores de fruto e cereais. Em Portugal, o metomil é um insecticida vendido sob a formulação comercial Lannate L[®] e Methomex 20 SL[®] que são comercializados, respectivamente, pelas empresas Dupont, SAPEC e Makhteshim (<http://www.dgadr.pt>). A nível nacional, no ano de 2007, foi

vendido um total de 627326 Kg de insecticidas e acaricidas, dos quais 5,64% correspondem a carbamatos. As vendas do princípio activo metomil, no ano de 2007, foram de 5386 Kg tendo sido registado um decréscimo de vendas de 2,85% em relação ao ano de 2006 (Vieira, 2008). O valor comercializado da substância activa metomil corresponde a 15,20% do valor dos carbamatos (35426 Kg). O uso dos carbamatos e organofosforados tem crescido progressivamente em alternativa aos organoclorados, cuja aplicação já foi proibida em muitos países (Hutson e Roberts, 1985). Os organoclorados são pesticidas potencialmente perigosos, persistentes no ambiente, com tendência a acumular-se nas cadeias alimentares. Estes pesticidas foram classificados, pela Organização Mundial de Saúde, como sendo “possíveis compostos cancerígenos para o Homem”. Em oposição, os carbamatos são selectivamente tóxicos, não são bioacumuláveis e são pouco persistentes, dado que apresentam um tempo de meia-vida (tempo médio necessário para que metade da quantidade aplicada do produto seja degradada) curto no ambiente (Stark e Walter, 1995). Muitos dos carbamatos podem sofrer hidrólise e produzir compostos menos tóxicos que o composto original (Baird, 1999; Vanloon e Duffy, 2001).

O modo de acção específico dos carbamatos consiste na inibição reversível da actividade catalítica da enzima acetilcolinesterase (AChE); esta enzima promove a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, necessária após a transmissão do impulso nervoso, o que leva à sua acumulação junto da sinapse. Esta acumulação provoca efeitos tais como: acumulação anormal de acetilcolina nas sinapses nervosas e nas junções neuromusculares provocando diminuição da actividade muscular (Roex *et al.*, 2003) e alterações comportamentais (e.g. hiperactividade, anorexia, asfixia) que podem mesmo provocar a morte dos organismos em graus mais elevados de intoxicação (Sismeiro *et al.*, 2007).

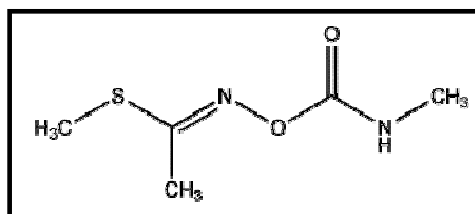


Figura 5. Estrutura molecular do Metomil
(adaptado de Kegley e Orme, 2007)

Tabela 1. Valores de CE₅₀ (concentração efectiva que produz um efeito em 50% dos organismos teste) para o princípio activo metomil para espécies não alvo

Produto Comercial	Organismo / CE ₅₀	Referência
Crustáceos		
Lannate 20L (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,033 mg L ⁻¹	Baer, 1991d
Metomil Técnico (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,032 mg L ⁻¹	Goodman, 1978
Metomil Técnico (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,009 mg L ⁻¹	USDI, 1978
Metomil Técnico (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,088 mg L ⁻¹	Mayer e Ellersieck, 1986
Metomil Técnico (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0317 mg L ⁻¹	FAO, 2002
Metomil (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0032 mg L ⁻¹	WHO, 1996, 2004
Metomil Técnico (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0088 mg L ⁻¹	Mayer e Ellersieck, 1986
NR (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0076 mg L ⁻¹	Mayer e Ellersieck, 1986
Metomil (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,017 mg L ⁻¹	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Metomil (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,02417 mg L ⁻¹	Pereira e Gonçalves, 2007
Metomil (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0317 mg L ⁻¹	Tomlin, 2001
Metomil (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =0,0287 mg L ⁻¹	Fernandez Alba <i>et al.</i> , 2002
Algas		
Lannate 20L (120h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ =116 mg L ⁻¹	Douglas e Halls, 1991
Metomil (72h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ ≥100 mg L ⁻¹	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Metomil Técnico (120h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ =60 mg L ⁻¹	FAO, 2002
Metomil Técnico (120h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ =60 mg L ⁻¹	Douglas e Handley, 1988
Metomil (72h)	algae CE ₅₀ =60 mg L ⁻¹	Tomlin, 2001
Metomil (72h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ =60 mg L ⁻¹	Fernandez Alba <i>et al.</i> , 2002
Oligoquetas		
Lannate 20L (7d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =165 mg Kg ⁻¹	Armstrong <i>et al.</i> , 1991
Lannate 20L (14d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =102 mg Kg ⁻¹	Armstrong <i>et al.</i> , 1991
Lannate 25WP (7d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =147 mg Kg ⁻¹	Armstrong <i>et al.</i> , 1991
Lannate 25WP (14d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =87 mg Kg ⁻¹	Armstrong <i>et al.</i> , 1991
Metomil (7d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =19 mg Kg ⁻¹	FAO, 2002
Metomil (14d)	<i>E. foetida</i> CE ₅₀ =0,017 mg Kg ⁻¹	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Metomil (14d)	<i>minhoca</i> CE ₅₀ =0,023 mg Kg ⁻¹	Tomlin, 2001

3.2. Herbicida Propanil

O herbicida Propanil pertencente à classe química das anilidas e é reconhecido pela IUPAC através da designação química 3,4-dicloropropionanilida (*vide* Figura 6). O propanil é um herbicida de contacto pós-emergente, altamente selectivo e de curta duração activa. É utilizado intensamente na cultura de arroz (*Oryza sativa*) para controlar as ervas infestantes (Mitsou *et al.*, 2006). Em Portugal, o propanil é vendido, entre outras, sob as formulações comerciais Stam Novel Flo 480®, Oryza ZA 480 Flow®, Surpocur WC® comercializados respectivamente, pelas empresas CEQUISA, SAPEC e BAYER (<http://www.dgadr.pt>). O princípio activo propanil, no ano de 2007, registou um decréscimo de 79,6% nas vendas em relação ao ano anterior, que poderá ser explicado pelo aparecimento de novos produtos no mercado com maior espectro de acção e com a mesma época de aplicação (Vieira, 2008). No ano de 2007 foram comercializados 11419 Kg de

propanil (Vieira, 2008). O propanil é solúvel em água e não é facilmente adsorvido pelas partículas do solo, o que favorece a sua mobilidade à superfície do solo, aumentando a possibilidade de contaminar os ecossistemas aquáticos que se encontram perto das culturas onde este é aplicado (Albanis *et al.*, 1998). O propanil é um químico muito específico e selectivo no seu modo de acção, actuando por inibição do transporte de electrões, ao nível do receptor do fotossistema II (Tomlin, 2001), nas espécies vegetais mais sensíveis (geralmente, ervas infestantes). Ao contrário das espécies em produção, as espécies sensíveis possuem quantidades residuais da enzima aril-acilamidase que catalisa a metabolização do propanil para os seus metabolitos primários (3,4-dicloroanilina e ácido propiónico) desactivando-o (Carey *et al.*, 1997). Assim, as espécies sensíveis não conseguem contrariar a intervenção do propanil no bloqueio da fotossíntese. Apesar de o propanil ser um pesticida desenhado para interferir com as vias metabólicas dos vegetais, vários estudos têm reportado toxicidade aguda para vários organismos do sistema aquático, de forma moderada nos peixes e de forma significativa no zooplâncton (Villarroel *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 1998).

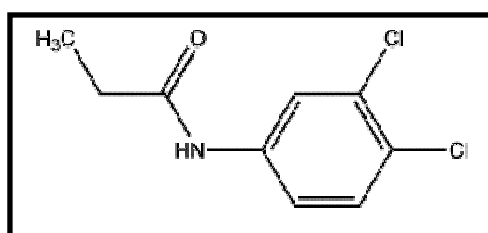


Figura 6. Estrutura molecular do Propanil
(adaptado de Kegley e Orme, 2007)

Tabela 2. Valores de CE₅₀ (concentração efectiva que produz um efeito em 50% dos organismos teste) e CL₅₀ (concentração que provoca um efeito letal em 50% dos organismos teste) para o princípio activo propanil para espécies não alvo.

Produto Comercial	Organismo/CE ₅₀	Referência
Crustáceos		
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =4,8 mg L ⁻¹	Tomlin, 2001
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =6,7 mg L ⁻¹	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
N.R (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =1,2 µg L ⁻¹	USEPA, 2000
N.R (48h)	<i>D. magna</i> CE ₅₀ =6,7 µg L ⁻¹	
N.R (48h)	<i>D. pulex</i> CE ₅₀ =11,4 µg L ⁻¹	
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =0,14 mg L ⁻¹	Rohm e Haas, 1991
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =3,55 mg L ⁻¹	WSSA, 1994
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =2,109 mg L ⁻¹	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Stam Novel Flo 480® (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =3,554 mg L ⁻¹	
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =3,55 mg L ⁻¹	Pereira e Gonçalves., 2007
Propanil (24h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =43,74 mg L ⁻¹	Villarroel <i>et al.</i> , 2003
Propanil (48h)	<i>D.magna</i> CE ₅₀ =5,01 mg L ⁻¹	

Tabela 2. (Continuação)

Algas		
N.R (120h)	<i>S. capricornutum</i> CE ₅₀ =29 µg L ⁻¹	USEPA, 2000
	<i>S. acutus</i> CE ₅₀ =0,29 mg L ⁻¹	
Propanil (72h)	<i>S. subcapitata</i> CE ₅₀ =0,33 mg L ⁻¹	Gómez <i>et al.</i> , 2004
	<i>C. vulgaris</i> CE ₅₀ =5,98 mg L ⁻¹	
Oligoquetas		
Propanil (48h)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ =734 mg Kg ⁻¹	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)

3.3. Herbicida Glifosato

O herbicida glifosato pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfatados e é reconhecido pela IUPAC pela designação química de N-(fosfonometil)glicina (*vide* Figura 7). Apresenta uma elevada polaridade, baixo peso molecular e elevada solubilidade em água (Kollman e Segawa, 1995). Desde 1971, quando foi relatado pela primeira vez como herbicida (Júnior, 2002), surgiram três tipos de formulações químicas de glifosato: glifosato isopropilamónio, glifosato sal de amónio e glifosato-trimésio. Em Portugal, o glifosato é comercializado sob várias formulações comerciais, das quais temos Roundup Forte[®], Roundup Ultra[®] e Spasor[®] comercializadas pela empresa Monsanto II (<http://www.dgadr.pt>). No ano de 2007, o glifosato foi o herbicida mais comercializado, as vendas atingiram os 1380573 Kg tendo sido registado um acréscimo de 35,2% em relação ao ano de 2006 (Vieira, 2008). O glifosato é um pesticida não selectivo, sistémico e pós-emergente, que representa actualmente 60% do mercado mundial de herbicidas não selectivos (Júnior, 2002). O glifosato apresenta uma elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas que não lhe sejam resistentes. O seu modo de acção primário consiste na inibição competitiva da enzima EPSP (do inglês: *5-endpyruvyl shikimate-3-P-synthetase*) uma enzima que pertence ao ciclo do ácido chiquimato, precursor principal da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, logo, a sua acção inibe a produção destes aminoácidos. Este ciclo está ligado ao metabolismo primário e secundário das plantas. Os principais produtos finais são os aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). Tais aminoácidos são precursores da lignina, dos flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos.

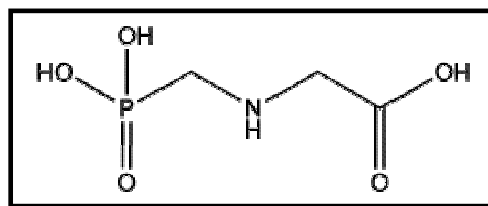


Figura 7. Estrutura molecular do Glifosato
(adaptado de Kegley e Orme, 2007)

Tabela 3. Valores de CE_{50} (concentração efectiva que produz um efeito em 50% dos organismos teste) e CL_{50} (concentração que provoca um efeito letal em 50% dos organismos teste) para o princípio activo glifosato para espécies não alvo.

Produto Comercial	Organismo/ CE_{50}	Referência
Crustáceos		
Glifos Plus (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=610 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.cheminova.com
Glifos (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=21,6 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup® Forte (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=42 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.monsanto.com
Spasor® Plus (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=676 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup® Supra (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=69 \text{ mg L}^{-1}$	
Latitude® (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=14 \text{ mg L}^{-1}$	
Spasor® (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=676 \text{ mg L}^{-1}$	
Spasor® Plus (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=676 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup® Pronto (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=1634 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup Ultra (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=676 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.bayercropscience.com
Glifosato isopropilamónio (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=930 \text{ mg L}^{-1}$	Tomlin, 2001
Glifosato trimesium (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=12 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=780 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato isopropilamónio (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=930 \text{ mg L}^{-1}$	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Glifosato trimesium (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=12 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=40 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato Técnico (48h)	<i>D. magna</i> $CL_{50}=780 \text{ mg L}^{-1}$	Monsanto, Lda - ABC Inc., 1978a
Sting (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=42 \text{ mg L}^{-1}$	Monsanto, Lda - ACB Inc., 1981a
Roundup D. Pak (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=930 \text{ mg L}^{-1}$	Monsanto, Lda - ACB Inc., 1981a
Roundup (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=5,3 \text{ mg L}^{-1}$	Monsanto, Lda – EG e G Bionomics, 1980e
Roundup (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=24-37 \text{ mg L}^{-1}$	Monsanto, Lda – EG e G Bionomics, 1980f
Roundup (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=7,3 \text{ mg L}^{-1}$	Folmar <i>et al.</i> , 1979
Ron-do (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=61,720 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	Alberdi <i>et al.</i> , 1996
Ron-do (48h)	<i>D. spinulata</i> $CE_{50}=66,180 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	
NR (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	USEPA, 2000
NR (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=134 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	
NR (48h)	<i>D. magna</i> $CE_{50}=2,950 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	Mayer e Ellersieck, 1986
Algas		
Glifos Plus (96h)	<i>S. subcapitatus</i> $CE_{50}=100 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.cheminova.com
Glifos (72h)	algae $CE_{50}=17,4 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup Forte (72h)	<i>P. subcapitata</i> $CE_{50}=6 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.monsanto.com
Roundup® Supra (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=14 \text{ mg L}^{-1}$	
Latitude® (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=13 \text{ mg L}^{-1}$	
Spasor® (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=284 \text{ mg L}^{-1}$	
Spasor® Plus (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=150 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup® Pronto (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=60 \text{ mg L}^{-1}$	
Roundup Ultra (72h)	<i>P. subcapitata</i> $CE_{50}=393 \text{ mg L}^{-1}$	http://www.bayercropscience.com
Glifosato isopropilamónio	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=72,9 \text{ mg L}^{-1}$	Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Glifosato trimesium	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=0,72 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=0,64 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato isopropilamónio (72h)	<i>S. subcapitatus</i> $CE_{50}=72,9 \text{ mg L}^{-1}$	Tomlin, 2001
Glifosato trimesium (72h)	Algae $CE_{50}=19 \text{ mg L}^{-1}$	
Glifosato (72h)	<i>S. capricornutum</i> $CE_{50}=485 \text{ mg L}^{-1}$	

Tabela 3. (Continuação)

Glifosato Técnico (72h)	<i>S. capricortumum</i> CE ₅₀ =1 mg L ⁻¹ .	Monsanto, Lda – LISEC, 1989b	
Roundup (72h)	<i>capricortumum</i> CE ₅₀ =2,5 mg L ⁻¹	Monsanto, Lda – LISEC, 1989b	
Roundup (72h)	<i>S. capricortumum</i> CE ₅₀ =8 mg L ⁻¹	Monsanto, Lda – LISEC, 1989a	
Ron-do (96h)	<i>S. acutus</i> CE ₅₀ =9,08 mg L ⁻¹ <i>S. quadricauda</i> CE ₅₀ =9,09 mg L ⁻¹ <i>S. acutus</i> CE ₅₀ =10,02 mg L ⁻¹ <i>S. quadricauda</i> CE ₅₀ =7,2 mg L ⁻¹	Alberdi <i>et al.</i> , 1996	
Glifosato (96h)	<i>C. pyrenoidosa</i> CE ₅₀ =3,530 mg L ⁻¹	Mayer e Ellersieck, 1986	
Glifosato (72h)	<i>P. subcapitata</i> CE ₅₀ =270 mg L ⁻¹	Cedergreen e Streibig, 2005	
Roundup 360 (72h)	<i>P. subcapitata</i> CE ₅₀ =64,7 mg L ⁻¹		
Oligoquetas			
Roundup Forte (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1,250 mg Kg ⁻¹ solo seco	http://www.monsanto.com	
Spasor Plus (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1,250 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Roundup® Supra (72h)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 2,700 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Latitude® (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ = 133 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Spasor® (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1250 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Spasor® Plus (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1250 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Roundup Ultra (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1,250 mg Kg ⁻¹ solo seco		
Glifosato isopropilamónio	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 480 mg Kg ⁻¹		Direcção Geral de Protecção de Colheitas (2009)
Glifosato trimesium	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1000 mg Kg ⁻¹		
Glifosato isopropilamónio (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 5000 mg Kg ⁻¹		
Glifosato trimesium (14d)	<i>E. foetida</i> CL ₅₀ ≥ 1000 mg Kg ⁻¹	Tomlin, 2001	

4. Biomarcadores

Os estudos de ecotoxicologia integram, normalmente, a realização de análises químicas, assim como testes ecotoxicológicos padronizados que na maior parte das vezes fornecem informações sob parâmetros ao nível do indivíduo (Van der Oost *et al.*, 2003).

De modo a avaliar os efeitos a níveis biológicos inferiores, surgiram os biomarcadores moleculares que se definem como respostas biológicas (e.g. moleculares, celulares, psicológicas, comportamentais) induzidas pela exposição de xenobióticos (Peakall, 1994). Os biomarcadores não devem surgir isolados, mas sim integrados em ensaios ecotoxicológicos onde se meçam parâmetros a nível individual ou até mesmo populacional (Doyotte *et al.*, 1997). Uma vez que maioritariamente, os primeiros efeitos tóxicos são induzidos a nível molecular, a utilização dos biomarcadores surgiu assim da necessidade de avaliar efeitos adversos ao nível sub-individual, antes que os efeitos se manifestem em níveis de organização biológica mais elevados. Deste modo, esperava criar-se a possibilidade de desenvolver acções de mitigação de riscos de forma mais rápida e eficaz. No entanto, segundo Castro *et al* (2004), os efeitos sentidos a nível sub-individual

nem sempre se reflectem a nível do indivíduo e da população. E de facto não existem ainda estudos que correlacionem os efeitos a nível sub-individual com os registados nas populações ou comunidades. Por este motivo, os biomarcadores poderão ser classificados como ecologicamente pouco relevantes e limitativos no seu uso como bioindicadores num processo de avaliação de risco. A solução poderá passar pelo estabelecimento de relações entre os biomarcadores e parâmetros considerados ecologicamente relevantes, tais como a reprodução e o crescimento.

A preocupação crescente na avaliação dos efeitos tóxicos sobre o compartimento terrestre, promoveu o desenvolvimento de testes ecotoxicológicos e de novos biomarcadores para organismos terrestres. Entre os invertebrados do solo, as minhocas são bons bioindicadores da contaminação terrestre (Arnaud *et al.*, 2000). A nível do sistema nervoso, a inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) surge como um dos biomarcadores moleculares mais utilizados para avaliar os efeitos tóxicos provocados por pesticidas organofosforados e carbamatos (Guilhermino *et al.*, 1996, Chambers *et al.*, 2004, Sismeiro-Vivas *et al.*, 2006). A acetilcolinesterase tem uma função determinante a nível das sinapses colinérgicas de vertebrados e invertebrados, sendo responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina após a passagem do impulso nervoso. A acetilcolina é um neurotransmissor, sendo uma das moléculas mais importantes envolvidas na transmissão do impulso nervoso. Este requer que a acetilcolina seja libertada no espaço inter-sináptico de modo a assegurar o prosseguimento das mensagens nervosas através da rede de neurónios até às terminações periféricas. A acetilcolina liga-se a um receptor colinérgico produzindo, desta forma, um potencial pós-sináptico e a consequente propagação do impulso nervoso (Roex *et al.*, 2003). Após este processo, a acetilcolina, desliga-se dos receptores voltando para a fenda sináptica onde é imediatamente hidrolisada pela acção da enzima acetilcolinesterase, que existe nas junções neuro-sinápticas, em ácido acético e colina. Os insecticidas (como é o caso do metomil) possuem a capacidade de se ligarem à enzima, inibindo-a e impedindo-a de desempenhar a sua função fisiológica. Nestas situações, o neurotransmissor acumula-se na fenda sináptica, resultando numa sobre-estimulação e despolarização da membrana pós-sináptica, que pode causar a morte. A inibição da acetilcolinesterase causa acumulações anormais de acetilcolina, nas sinapses nervosas e nas junções dos neurotransmissores, provocando a desactivação dos tecidos musculares (Roex *et al.*, 2003). As colinesterases são fortemente inibidas por insecticidas

organofosforados e carbamatos a concentrações ecologicamente relevantes, pelo que têm sido utilizadas para avaliar a exposição e o efeito destes químicos em diversos organismos (Guilhermino *et al.*, 1998). A inibição da enzima acetilcolinesterase, nas minhocas, é um biomarcador bastante utilizado, por apresentar uma metodologia bem fundamentada e de fácil desenvolvimento e por possuir um baixo custo de análise e promover respostas rápidas, sendo altamente sensível ao efeito tóxico dos pesticidas (Capowiez *et al.*, 2003).

5. Objectivos da dissertação

A presente dissertação pretendeu gerar dados ecotoxicológicos de alguns pesticidas, em espécies não alvo, para futuras avaliações de risco ou para a notificação de três princípios activos (glifosato, propanil e metomil). Neste contexto, foram utilizados organismos padrão em ecotoxicologia aquática e terrestre. Numa primeira abordagem, foram realizados testes agudos (*Daphnia magna*), testes de inibição de crescimento (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e de evitamento (*Eisenia andrei*). Na segunda fase do trabalho, sabendo que a actividade da enzima acetilcolinesterase é fortemente inibida por insecticidas organofosforados e carbamatos, este biomarcador foi utilizado como indicador de avaliação do efeito do princípio activo metomil sobre *Eisenia andrei*, em paralelo com um ensaio de evitamento. Deste modo, os objectivos específicos da presente dissertação foram:

- avaliar os efeitos da exposição aos princípios activos glifosato, propanil e metomil em organismos não alvo;
- avaliar a influência do princípio activo metomil na actividade da enzima acetilcolinesterase em *Eisenia andrei*, e subsequentemente na sua resposta de evitamento ao solo contaminado com o composto.

6. Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em dois capítulos, de acordo com os objectivos específicos propostos. Estes são precedidos por uma Introdução Geral onde é feita uma revisão da literatura, relevante para o enquadramento do trabalho. O Capítulo I e Capítulo II apresentam-se escritos sobre a forma de artigo científico e pretendem descrever o trabalho desenvolvido de modo a atingir os objectivos específicos previamente definidos.

Referências Bibliográficas

- ABC Inc. (1978a) Acute Toxicity of Technical Glyphosate (AB-78-201) to *Daphnia magna*. Columbia, Missouri, Analytical Biochemistry Laboratories, Inc. (Unpublished report submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- ABC Inc. (1981a) Acute toxicity of MON 0139 (Lot LURT 12011) (AB-81-074) to *Daphnia magna*. Columbia, Missouri, Analytical Biochemistry Laboratories, Inc. (Unpublished report submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- ABC Inc. (1981b) Acute toxicity of MON 0139 (Lot LURT 12011) (AB-81-073) to *Lepomis macrochirus*. Columbia, Missouri, Analytical Biochemistry Laboratories, Inc. (Unpublished report submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- Albanis TA, Hela DG, Sakellarides TM e Konstantinou IK (1998). Monitoring of pesticides residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N.Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal Chromatography A* 823: 59-71.
- Alberdi JL, Saenz ME, Dimarzio WD e Tortorelli MC (1996). Comparative acute toxicity two herbicides, paraquat and glyphosate to *Daphnia magna* and *Daphnia spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57(2): 229-235.
- Amaro P (2003). *Protecção Integrada*. Edição. Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, Lisboa.
- Armstrong K, Caley CY, Hall BE e Knight B (1991). Lannate 20L: Determination of acute toxicity (LC₅₀) in earthworms. Tranent, Scotland, Inveresk Research International Ltd. (<http://www.inchem.org>).
- Antunes SC, Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R e Gonçalves F (2007). Evolution of water column and sediment toxicity from abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374: 252-259.
- Arnaud C, Saint-Denis M, Narbonne JF, Soler P e Ribera D (2000). Influences of different standardized test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology e Biochemistry* 32: 67-73.
- Baer KN (1991d). Static, acute, 48 hour EC₅₀ of Lannate^R 20L to *Daphnia magna*. Newark, Delaware, Du Pont de Nemours EI e Co. *Haskell Laboratory* (Unpublished report nº HLR: 150-91). (<http://www.inchem.org>).
- Baird C (1999). *Química Ambiental*, 2ª edição Porto Alegre: Editora Artmed.
- Barr DB e Needham LL (2002). Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *Journal of Chromotography B* 778: 5-29.

- Batista S, Silva E, Galhardo S, Viana P e Cerejeira MJ (2002). Evaluation of pesticide contamination of ground water in two agricultural áreas of Portugal. *International Journal Environmental Analytical Chemistry* 82: 601-609.
- Beck L e Römbke J (2005). Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 189-200.
- Brack W, Klamer HJC, de Alda ML e Barceló D (2007). Effects-directed analysis of key toxicants in European river basins. *Environmental Science and Pollution Research* 14: 30-38.
- Brown CD, Carter AD e Holis JM (1995). *Soils and pesticide mobility*. In: Roberts TR e Keamey PC (Eds.) *Environmental Behaviour of Agrochemicals* (Vol.9- Series: Progress in pesticide biochemistry and technology). John Wiley & Sons, West Sussex.
- Capowiez Y, Rault M, Mazzia C e Belzunces L (2003). Earthworm behaviour as a biomarker- a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47: 542-547.
- Carey VF III, Hoagland RE e Talbert RE (1997). Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass: II: In-vivo metabolism of the propanil molecule. *Pesticide Science* 49:333-338.
- Carvalho FP (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* 9: 685-692.
- Castro BB, Sobral O, Guilhermino L, Ribeiro R (2004). *In Situ* Bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13: 667-681.
- Castro M, Silva-Ferreira AC, Manaia CM e Nunes OC (2005). A case study of molinate application in the Portuguese rice field: herbicide application and proposal of a clean-up methodology. *Chemosphere* 59: 1059-1065.
- CE (Comissão Europeia) (1991). Directiva 91/414/EEC do Conselho, de 15 de Junho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 230 de 19.08.1991:1-32.
- CE (Comissão Europeia) (1993). Directiva 93/67/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1993, que estabelece os princípios para a avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente das substâncias notificadas, em conformidade com a Directiva 67/548/CEE do Conselho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 227 de 08.09.1993:9-18.
- CE (Comissão Europeia) (1993a). Regulamento (CEE) 793/93 do Conselho, de 23 de Março de 1993, relativo à avaliação e controlo dos riscos ambientais associados às substâncias existentes. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L84 de 05.04.1993:1.
- CE (Comissão Europeia) (1994). Regulamento (CE) nº 1488/94 da Comissão, de 28 de Junho de 1994, que estabelece os princípios para a avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente associados às substâncias existentes, em conformidade com o Regulamento (CEE) nº 793/93 do Conselho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 161 de 29.06. 1994: 3-5.

- CE (Comissão Europeia) (1998). Directiva 98/83/CE do Conselho, de 3 de Novembro de 1998, relativa à qualidade de água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L330 de 05.12.1998:32-54.
- CE (Comissão Europeia) (2002a). Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology- under Council Directive 91/414/EEC. European Commission- Health e Consumer Protection Directorate- General, Pp.39.
- CE (Comissão Europeia) (2002b). Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology- in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission- Health e Consumer Protection Directorate- General, Pp.62.
- CE (Comissão Europeia) (2005). Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L70 de 16.03.2005:1-16.
- CE (Comissão Europeia) (2006). Regulamento (CE) nº1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH). Este Regulamento cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos alterando a Directiva 1999/45/CE e revogando o Regulamento (CEE) nº 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) nº1488/94 da Comissão, bem como a Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L396 de 30.12.2006:1-854.
- CE (Comissão Europeia) (2007). The use of Plant Protection Products in the European Union- data 1992-2003. European Communities- Eurostat, Luxembourg, Pp.215.
- CEC (Comissão das Comunidades Europeias) (2002). Towards a thematic strategy on the sustainable use of pesticides. Communication from the Commission to the council, the European parliament and economic and social committee, COM (2002) Commission of the European communities, Brussels, Pp.349.
- Cedergreen N e Streibig JC (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pesticides Management Science* 61: 1152-1160.
- Cerejeira MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valério MJ, Silva A, Ferreira M e Silva-Fernandes AM (2003). Pesticides in Portuguese Surface and Ground Waters. *Water Resources* 37: 1055-1063.
- Chambers JE, Boone JS, Carr RL, Chambers HW e Straus, David L (2004). Biomarkers as predictors in Health and Ecological Risk Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 8 (1): 165-176.

- Connell D, Lam P, Richardson B e Wu R (1999). *Introduction to ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford.
- Douglas MT e Handley JW (1988). The algistatic activity of Methomyl Technical. Huntingdon, United Kingdom, Huntingdon Research Centre (Unpublished report n° DPT-171(j) 871676). (<http://www.inchem.org>).
- Douglas MT e Halls RWS (1991). *The algistatic activity of Lannate 20L*. Huntingdon, United Kingdom, Huntingdon Research Centre (Unpublished report n° DPC-16(f) 91399). (<http://www.inchem.org>).
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M e Vasseur P (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39: 93-110.
- EG e Bionomics G (1980e). Acute toxicity of Roundup to the water flea (*Daphnia magna*). Aquatic Toxicology Laboratory. Wareham, Massachusetts, EG e Bionomics G (Unpublished report n° BW-80-4-636 submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- EG e Bionomics G (1980f) Acute toxicity of Roundup to the water flea (*Daphnia magna*) with and without continuous aeration. Aquatic Toxicology Laboratory. Wareham, Massachusetts, EG e Bionomics G (Unpublished report N° BW-80-6-690 submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2002). *Specifications and evolutions for plant protection products, Methomyl*. The United Nations. (<http://fao.org>)
- Fernández -Alba AR, Hernando D, Agüera A, Cáceres J e Malato S (2002). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research* 36: 4255-4262.
- Flury M (1996). Experimental evidence of transport of pesticides through field soils- a review. *Journal of Environmental Quality* 25: 25-45.
- Folmar LC, Sanders HO e Julin AM (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8: 269-278.
- Green J (2000). Adjuvant Outlook for Pesticides. *Pesticide Outlook* 11: 196-199.
- Golfinopoulos SK, Nikolaou AD, Kostopoulou MN, Xilourgidis NK, Vagi MC e Lekkas DT (2003). Organochlorine pesticides in the surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 50: 507-516.
- Gómez de Barreda Ferraz D, Sabater C e Carrasco JM (2004). Effects of propanil, tebufenozide and mefenacet on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Chemosphere* 56: 315-320.

- Goodman NC (1978). 48 hour LC₅₀ to *Daphnia magna*. Newark, Delaware, Du Pont de Nemours EI e Co., Haskell Laboratory (Unpublished report n° HLR-165-78). (<http://www.inchem.org>).
- Guest RK, Ikehata K, El-Din MG e Smith DW (2006). Pesticides and herbicides. *Water Environment Research* 78: 1755-1801.
- Guilhermino L, Lopes CM, Arsélio PC e Soares AMVM (1996). Inhibition of Acetylcholinesterase activity as effect critério in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2 (4): 727-738.
- Guilhermino L, Barros P, Silva MC e Soares AMVM (1998). "Short Communication should the use of inhibition of cholinesterases a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned". *Biomarkers* 3 (2): 157-163.
- Huston DH e Roberts TR (1985). Insecticides- progress in pesticide biochemistry and toxicology. In: Insecticides. Editado por: Hutson DH, Roberts TR. Chichester: John Wiley e Sons. West Sussex.
- Jamet P (1994). The Cost Action 66: fate of pesticides in the soil and the environment. In: Copin A, G Houins, L. Pussemier e JF. Salembier (Eds)- Proceedings 5th International Workshop Environmental Behaviour of Pesticides and Regulatory Aspects, Brussels, Belgium, April 26-29 1994. European Study Service, Rixensart, Belgium.
- Júnior O e Santos T (2002). *Química Nova* (25) 3: 420-428.
- Kanwar RS (1996). *Agrochemicals and water management*. In: LS Pereira, RA Freddes, JR Gilley e B Lesaffre (eds.). Sustainability of irrigated agriculture. NATOASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Kegley S, Hill B e Orme S (2007). PAN pesticides database. Pesticide Action Network, North America. San Francisco (<http://www.pesticideinfo.org>).
- Kollman W e Segawa R (1995). Interim report of the pesticide chemistry database: environmental hazards assessment program. Environmental Protection Agency and Department of Pesticide Regulation. State of California.
- LISEC (1989a). Alga, growth inhibition test. Effect of MON 2139 on the growth of *Selenastrum capricornutum*. Bokrijk, Belgium, LISEC, Study Centre for Ecology and Forestry (Unpublished report submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- LISEC (1989b). Alga, growth inhibition test. Effect of MON 8755 on the growth of *Selenastrum capricornutum*. Bokrijk, Belgium, LISEC, Study Centre for Ecology and Forestry (Unpublished report submitted by Monsanto Ltd). (<http://www.inchem.org>).
- Leonard RA (1990). Movement of pesticides into surface waters. In: Cheng HH (Eds). Pesticides, impacts, and modelling. (2^aeds) Madison. Soil Science Society of America: 303-349.

- Loague K, Corwin DL e Ellsworth TR (1998). The challenge of predicting non-point source pollution. *Environmental Science and Technology* 32A: 130-133.
- Ma J, Wang P, Chen J, Sun Y e Che J (2007). Differential response of Green Algal Species *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* to Six Pesticides. *Polish Journal of Environmental Studies* (16) 6: 847-851.
- Mayer FL e Ellersieck MR (1986). *Manual of acute toxicity*: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Washington, DC, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service (Resource Publication nº 160). (<http://www.inchem.org>).
- Mitsou K, Koulianou A, Lambropoulou D, Pappas P, Albanis T e Lekka M (2006). Growth rate effects of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere* 62: 275-284.
- Mendes CD, Pereira JL e Gonçalves F (2007). Acute and Chronic effects of Stam Novel Flo® (commercial solution) and its active ingredient Propanil in *Daphnia magna*. *Fresenius Environmental Bulletin* (16) 5: 537-542.
- Moore MT, Pierce JR, Milam CD, Farris JL e Winchester EL (1998). Responses of non-target aquatic organisms to aqueous Propanil exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 169-174.
- Newman MC e Unger MA (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers.
- Nimmo DR e MCewen LC (1994). Pesticides. In: Calow P (Eds)- *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, (2): 155-203.
- O'Halloran K (2006). Toxicological considerations of contaminants in the terrestrial environment for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 12: 74-83.
- Pereira JL e Gonçalves F (2007). Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. *Science of the Total Environment* 386:9-20.
- Pereira JL (2008). Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes considerações de stress. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro, para obtenção do grau de Doutor em Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Peakall DW (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman e Hall, London.
- Peakall DW (1994). Biomarkers: The way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology* (1): 55-60.
- Ribeiro ML, Lourencetti C, Pereira SY e Marchi MRR (2007). Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Química Nova* 30: 460-466.

- Roex EWM, Keijzers R e Van Gestel CAM (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology* 64: 451-460.
- Rohm G e Haas M (1991). Products: STAM Technical 98% DCA herbicide. Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA. (<http://www.inchem.org>).
- Sabik H, Jeannot R e Rondeau B (2000). Multiresidue methods using solid-phase extraction technique for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of Chromatography A* (885) 1: 217-236.
- Sismeiro-Vivas J, Abrantes N, Pereira JL, Castro BB, Gonçalves F (2007). Short-Term Effects of Quirlan® (Chorfenvinphos) in the Behavior and Acetylcholinesterase Activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology*: 194-202.
- Solomon KR e Sibley P (2002). New concepts in ecological risk assessment: Where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin* 44: 279-285.
- Suter GW (1993). *Ecological Risk Assessment*. Lewis publishers Inc. Boca Raton, Florida.
- Stark JD e Walter JF (1995). Neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. *Journal Agriculture Food Chemistry* 43: 507-512.
- Tauler R, De Almeida Azevedo D, Lacorte S, Viana P e Barceló D (2001). Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environmental Technology* 22: 1043-1054.
- Tomlin CDS (2001). *The pesticide manual*. British Crop Protection Council, Surrey.
- USDI (1978). *Methomyl - Summary of acute toxicity*. Columbia, Missouri, United State Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Columbia National Fishery Research Laboratory. (<http://www.inchem.org>).
- USEPA (1998). *Guidelines for ecological risk assessment*. EPA/630/R-95/002F. *Risk Assessment Forum*. Washington, DC. United States Environmental Protection Agency.
- USEPA (2000). *Office of Pesticide Programs- Environmental Fate and Effects Division*. Washington, DC. United States Environmental Protection Agency. (<http://www.inchem.org>).
- Van der Oost R, Beyer J e Vermeulen NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Vanloon GW e Duffy SJ (2001). *Environmental Chemistry, a Global Perspective*. Oxford: Oxford University Press.
- Vieira MM (2008). Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2007. Direcção de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Serviços de produtos fitofarmacêuticos e sanidade vegetal. Oeiras.

- Villarroel MJ, Sancho E, Fernando MD e Andreu E (2003). Acute, chronic and sub lethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857-864.
- Waldron AC (1997). *Pesticides and groundwater contamination*. Ohio Cooperative Extension Service, The Ohio State University, Ohio, USA.
- WSSA (1994). *Herbicide Handbook*, 7^a Eds. Champaign IL. Weed Science Society of America. (<http://www.inchem.org>).
- Weber JB e Miller CT (1989). Organic Chemical Movement over and through soil. *In*: Sawhney BL, Brown K (Eds.). *Reactions and movements of organic chemicals in soils*. (SSSA special publication; n°22), Madison.
- WHO (1996). *Methomyl- Environmental Health Criteria*, Vol.178, Geneva: World Health Organization. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2004). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification*. Geneva: World Health Organization.

Capítulo I

Avaliação da toxicidade de três princípios activos de pesticidas largamente utilizados em Portugal, em organismos não alvo

CAPÍTULO I

Avaliação da toxicidade de três princípios activos de pesticidas largamente utilizados em Portugal, em organismos não alvo

Resumo

A utilização de pesticidas na protecção das culturas apresenta-se como uma mais valia, no aumento quantitativo e qualitativo da produção agrícola. No actual contexto comunitário e nacional, a preocupação acerca dos efeitos dos pesticidas sobre os ecossistemas aquático e terrestre é um assunto de extrema importância. Presentemente, não são ainda exigidos estudos ecotoxicológicos do efeito de um novo pesticida, que seja colocado no mercado, sobre organismos não alvo (Directiva 414/91/CEE). Reconhecendo esta lacuna, este trabalho teve como objectivo avaliar os possíveis efeitos ecotoxicológicos da exposição de três princípios activos (glifosato, propanil e metomil) em organismos não alvo dos sistemas aquáticos (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Daphnia magna*) e terrestres (*Eisenia andrei*). Os princípios activos escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho tiveram por base o facto de serem constituintes dos pesticidas mais comercializados em Portugal. Para a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos sobre as espécies acima enumeradas, foram realizados testes laboratoriais seguindo protocolos padronizados onde foram medidos diferentes parâmetros: inibição de crescimento de *P. subcapitata*, imobilização/mortalidade de *D. magna* e comportamento de evitamento de *E. andrei*. Os resultados obtidos nos testes de inibição do crescimento algal indicam que *P. subcapitata* apresentou uma elevada sensibilidade ao princípio activo propanil ($CE_{50}=0,031 \text{ mg L}^{-1}$), quando comparada com os outros princípios activos testados, cujos valores de CE_{50} são de 108 mg L^{-1} para o metomil e 129 mg L^{-1} para o glifosato. Relativamente a *D. magna*, esta apresentou maior sensibilidade ao princípio activo metomil ($CE_{50}=0,021 \text{ mg L}^{-1}$) do que ao propanil ($CE_{50}=2,1 \text{ mg L}^{-1}$). Para o princípio activo glifosato foram testadas concentrações até 2000 mg L^{-1} e não foram registados valores de toxicidade. Os dados obtidos com os testes com *E. andrei* demonstraram um evitamento significativo apenas para os solos contaminados com metomil a partir da concentração de $1,02 \text{ Kg ha}^{-1}$. Os efeitos negativos dos princípios activos, registados nos organismos não alvo, evidenciam a necessidade de se implementar legislação mais protectora na regulamentação da colocação de xenobióticos no mercado, baseada em informação ecotoxicológica obtida para o maior número possível de espécies com diferentes sensibilidades e pertencentes a diferentes níveis tróficos.

Palavras-chave: Propanil, Glifosato, Metomil, CE_{50} , Toxicidade, Evitamento, *D. magna*, *P. subcapitata*, *E. andrei*

1. Introdução

Em Portugal e no resto dos países da Europa, o uso de pesticidas em larga escala tem suscitado preocupação científica, no que concerne ao impacto que estes químicos têm sobre os ecossistemas terrestre e aquático. Os pesticidas são tóxicos aplicados intencionalmente no ambiente de modo a repelir, controlar e mitigar pestes. No entanto, muitos destes químicos actuam de forma nefasta em espécies não alvo de maior sensibilidade. Uma vez que estas substâncias representam riscos, é imprescindível avaliá-los, a fim de estabelecer, caso seja necessário, medidas de prevenção visando a protecção do ambiente. A tendência geral para o desenvolvimento e preferência pelos pesticidas designados como “contemporâneos” reside no facto de estes serem selectivamente tóxicos, não serem bioacumuláveis e apresentarem pouca persistência no ambiente (Stark e Walter, 1995). Os pesticidas contaminam o compartimento terrestre e aquático, por pulverização ocasional ou directa, por escorrência ou ainda por lixiviação (Cerejeira *et al.*, 2003). Alguns pesticidas desenhados para combater pragas agrícolas são reportados na literatura como perigosos, a baixas concentrações, para os organismos aquáticos vertebrados e invertebrados (e.g. Moore *et al.*, 1998). Os cladóceros, mais especificamente os pertencentes ao género *Daphnia*, e as algas são comumente usados como organismos teste, sendo recomendados em procedimentos padronizados em ecotoxicologia aquática (e.g. OECD 1998; OECD 2004; OECD 2006).

Os ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres surgiram quer para avaliar a toxicidade de substâncias químicas adicionadas a solos padronizados, quer para avaliar solos potencialmente contaminados. O oligoqueta *Eisenia andrei* é frequentemente usado como organismo teste dado que é responsável por funções importantes no solo (e.g. arejamento do solo e reciclagem de nutrientes) e apresenta uma enorme sensibilidade a contaminantes tornando-se assim um indicador relevante de alterações ambientais (Römbke *et al.*, 2005).

Os procedimentos de análise de risco ecológico pressupõem que o risco de um determinado contaminante resulta da interacção entre a exposição e os efeitos (SETAC, 1997). Neste contexto, são avaliados os efeitos dos pesticidas nos ecossistemas ambientais. Uma das etapas da análise de risco consiste na realização de testes de toxicidade aguda e crónica, que determinam os efeitos letais e sub-letais, ao nível do indivíduo. Numa

avaliação aguda, os organismos são expostos ao químico, em concentrações relativamente elevadas, durante um reduzido período de tempo. As concentrações dos pesticidas testadas nestes ensaios, geralmente, não são ecologicamente relevantes, uma vez que são bastante superiores às concentrações aplicadas/existentes no meio ambiente. A avaliação crónica já pressupõe avaliações ao nível da população e comunidades, sendo levada a cabo em testes de longa duração em que são avaliados parâmetros sub-letais (e.g. crescimento, fecundidade etc.). Dos testes de toxicidade são obtidos parâmetros de toxicidade CL_{50} (concentração letal para 50% dos organismos testados), CE_{50} (concentração que afecta 50% dos organismos testados), NOECs (maior concentração testada para a qual não se observam efeitos) e/ou LOECs (menor concentração testada para a qual se observam efeitos) que são integrados em curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (*do inglês Species Sensitivity Distribution curves - SSD curves*) que permitem derivar doses limiares que afectam apenas uma determinada percentagem de espécies do ecossistema (geralmente 5%) (Posthuma *et al.*, 2002). Esta metodologia, quando aplicada, confere uma grande confiança estatística ao processo de análise de risco, comparada com outras metodologias existentes (Wheler *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos esta metodologia tem sido já aplicada em processos de análise de risco (e.g. Solomon *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 2000), na Europa, já em 2002 se previa a sua inclusão nos documentos técnicos da Comissão Europeia que dão indicações relativamente à análise de risco de novas substâncias químicas (Wheler *et al.*, 2002).

Contudo a construção de curvas SSD depende da quantidade e sobretudo da qualidade dos dados existentes (Wheler *et al.*, 2002) e inúmeros são os pesticidas que apresentam escassez de dados ecotoxicológicos para espécies não alvo. Deste modo, o presente estudo pretendeu gerar informação toxicológica para três princípios activos (metomil, propanil e glifosato) de pesticidas amplamente utilizados em Portugal. Para o efeito foram realizados testes agudos com o cladóceros *Daphnia magna* e a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para avaliar o compartimento terrestre foram realizados testes de evitamento com *Eisenia andrei*.

2. Material e Métodos

2.1. Organismos teste

As espécies *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* e *Eisenia andrei* foram os organismos teste utilizados para avaliar a toxicidade dos princípios activos glifosato, propanil e metomil, através de ensaios padronizados. Estes organismos foram escolhidos tendo em conta os diferentes compartimentos ambientais a que pertencem (aquático e terrestre), devido à sua elevada relevância ecológica e por serem amplamente usados em ensaios ecotoxicológicos padronizados. As espécies testadas apresentam-se como organismos não alvo relativamente aos princípios activos/pesticidas testados. Para o compartimento aquático foram utilizadas duas espécies planctónicas: a microalga verde (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e o crustáceo cladóceros (*Daphnia magna*) (clone A, *sensu* Baird *et al.*, 1989). Para o compartimento terrestre, o oligoqueta *Eisenia andrei* foi a espécie escolhida. Para além dos motivos já apresentados anteriormente, para a escolha destas espécies, estas foram igualmente seleccionadas por desempenharem um papel fundamental nas teias tróficas dos respectivos compartimentos ambientais. Assim, qualquer químico que seja tóxico para estes organismos terá um potencial elevado para promover efeitos adversos nos respectivos ecossistemas. Estas espécies são recomendadas em protocolos padronizados internacionais para avaliar a toxicidade aguda e crónica de diversos químicos [e.g. pesticidas, metais e efluentes diversos (OECD 1984; OECD 2004; OECD 2006; ISO 1996; ISO 2005)]. A selecção destas espécies como organismos padrão assenta numa série de características que detêm e que facilitam a execução prática de testes ecotoxicológicos: (i) fáceis de manter em condições laboratoriais controladas; (ii) envolvem baixos custos de manutenção; (iii) não requerem protocolos de cultura complexos; (iv) apresentam um ciclo de vida curto e muito produtivo, que permite uma fácil e rápida obtenção de organismos em número suficiente para realizar os processos experimentais.

2.1.1 *Pseudokirchneriella subcapitata*

P. subcapitata é uma microalga unicelular, com um único cloroplasto longo e verde, sendo a sua cor verde devida à presença de clorofila *a* e *b*. É frequente encontrar-se em agrupamentos não coloniais de 4 a 16 indivíduos ou, mais raramente, em células isoladas. Reproduz-se assexuadamente através de auto-esporos, produzindo pequenas réplicas da célula-mãe (Wetzel, 1993). Divide-se uniformemente e não adere a superfícies, sendo esta uma característica vantajosa para a realização de testes ecotoxicológicos (Reynolds, 1975). Esta alga encontra-se geralmente em meios de água doce, sendo contudo capaz de tolerar condições de salinidade muito variadas (Reynolds, 1975). É capaz de viver em meios pobres em nutrientes, mas nestas condições a produtividade e o crescimento da população são limitados. Ecologicamente, esta microalga é um componente comum do fitoplâncton de massas de água doce; o fitoplâncton engloba o conjunto de produtores primários da cadeia trófica que se encontram suspensos na coluna de água. Ao constituir o nível trófico de base nas cadeias alimentares, o fitoplâncton é um componente essencial no ecossistema aquático. As algas produzem oxigénio e matéria orgânica fundamental para sustentar os níveis tróficos superiores. A qualidade, quantidade e composição bioquímica das espécies algais pode condicionar a fisiologia dos organismos pertencentes a níveis tróficos superiores, o seu crescimento, reprodução e, assim, influenciar a taxa de produtividade secundária e a estrutura das populações do ecossistema (Cetin e Mert, 2006).

Algas unicelulares pertencentes aos géneros *Pseudokirchneriella*, *Chlorella* e *Chlamydomonas* são frequentemente usadas como organismos teste em procedimentos padronizados de avaliação de toxicidade de variados químicos (OECD, 2006), de efluentes e elutriados (USEPA, 2002), abordando desta forma os efeitos adversos que os compostos ou as matrizes ambientais contaminadas podem promover em organismos fitoplanctónicos do sistema aquático.

A manutenção laboratorial de *P. subcapitata* é relativamente simples. A cultura é mantida em meio sintético *Woods Hole* MBL (Stein, 1973), num sistema semi-contínuo e sob condições de temperatura e fotoperíodo controlado ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 24 horas de iluminação). O meio *Woods Hole* MBL é preparado usando água destilada, à qual se adicionam os diversos macronutrientes e micronutrientes essenciais ao crescimento algal. Para isso adiciona-se 1 mL de cada solução stock [$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($36,76 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($36,97 \text{ g}$

L⁻¹), NaHCO₃ (12,60 g L⁻¹), K₂HPO₄ (8,71 g L⁻¹), NaNO₃ (85,01 g L⁻¹), Na₂SiO₃.9H₂O (28,42 g L⁻¹), Na₂EDTA (4,36 g L⁻¹), FeCl₃.6H₂O (3,15 g L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0,01 g L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0,022 g L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0,01 g L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0,18 g L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0,006 g L⁻¹)] e 2 mL de Tris (hydroxylmethyl)-amino-metano (50 g 200 mL⁻¹) por cada litro de MBL a preparar. Após a adição das soluções stock ao volume de água destilada correspondente à quantidade de meio que se pretende preparar, este é esterilizado por autoclavagem (120°C, 30 min.). Antes de se proceder à transferência de um inóculo de algas, para meio MBL, de forma a dar início a uma nova cultura, é adicionado 1 mL de um preparado de vitaminas [Thiamina HCl (B₁); Biotina (H) e Cyanocobalamina (B₁₂)].

2.1.2 *Daphnia magna*

D. magna é um crustáceo cladóceros facilmente cultivado em laboratório, dado que apresenta um tamanho suficientemente grande para ser manuseado, sem contudo exigir volumes muito grandes de meio e condições de cultura complexas. Pela sua elevada sensibilidade a uma vasta gama de tóxicos, esta espécie é utilizada em ensaios ecotoxicológicos laboratoriais em todo o mundo (Villarroel *et al.*, 2003), sendo por isso classificado como organismo de excelência em ecotoxicologia aquática. Estes crustáceos têm um ciclo de vida curto, com uma elevada taxa reprodutiva, o que permite obter organismos em número suficiente e no tamanho ou estágio de crescimento requerido para satisfazer desenhos experimentais complexos (Lampert, 2006). A reprodução é partenogenética cíclica: em condições favoráveis, a população é composta essencialmente por fêmeas que se reproduzem por partenogénese, originando organismos geneticamente idênticos, o que permite reduzir a variabilidade genotípica das respostas quando usados como organismos teste em ensaios laboratoriais (Deng e Lynch, 1996); em condições desfavoráveis (e.g. variações na temperatura, fotoperíodo, quantidade de alimento, sobrepopulação), alguns ovos produzidos por partenogénese originam machos, que marcam a opção pela reprodução sexuada.

Segundo Lampert (2006), também a posição ecológica nos sistemas pelágicos de água doce reforçam o reconhecimento de *Daphnia* como organismo teste. *Daphnia* é um zooplancote que ocupa uma posição chave nas interações tróficas dos ecossistemas

lênticos (Lampert, 2006). Estes organismos são consumidores primários do fitoplâncton e fonte de alimento para os consumidores secundários (Wetzel, 1993; Lampert, 2006). Os organismos pertencentes ao género *Daphnia* são filtradores, alimentam-se de algas, bactérias e detritos orgânicos suspensos na coluna da água. Por outro lado, os cladóceros, ao serem um importante recurso alimentar para os peixes planctívoros, assumem um papel essencial na transferência de energia dos produtores primários para os níveis tróficos mais elevados. As respostas dos consumidores primários da cadeia trófica são, por isso, consideradas informativas em relação aos impactos de pesticidas em sistemas aquáticos (Islam e Tanaka, 2004).

As culturas laboratoriais de *Daphnia* devem garantir a produção de neonatos com qualidade e em número suficiente para a realização de testes de toxicidade aguda e/ou crónicos e assegurar uma produção contínua. As culturas laboratoriais destes organismos (*Daphnia*) são conduzidas em copos de vidro de 1L, contendo aproximadamente 800 mL de meio artificial ASTM “hard-water” (ASTM, 1980), sob condições de incubação controladas (temperatura $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; fotoperíodo $16^{\text{L}}:8^{\text{E}}$). O meio ASTM é um meio pobre em sais, requerendo concentrações definidas de NaHCO_3 ($19,20 \text{ g L}^{-1}$), MgSO_4 ($24,57 \text{ g L}^{-1}$), KCl ($0,80 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,40 \text{ g 2L}^{-1}$), dissolvidos em água destilada ou ultra-pura. A solução de ASTM é ainda aditivada com uma solução combinada de vitaminas [adaptado do meio Elendt M₇ (Elendt e Bias, 1990)]. Durante a manutenção das culturas de *Daphnia*, o meio sintético é enriquecido com a adição de um aditivo orgânico (extracto de *Ascophyllum nodosum*, uma alga marinha) para garantir as melhores condições para a reprodução, além do alimento (*P. subcapitata*).

Os protocolos padronizados recomendam que se utilize uma taxa geral de 1 adulto por cada 2 mL de meio de cultura, uma vez que está documentado que grandes densidades de organismos numa cultura podem comprometer e/ou inibir o crescimento e reprodução dos organismos devido à consequente limitação alimentar (Baird *et al.*, 1989). Estes mecanismos têm um efeito preponderante a longo prazo nas culturas de laboratório, mas são simplesmente controlados evitando culturas com misturas de idades e removendo os neonatos, logo que possível. O meio de cultura enriquecido com o aditivo orgânico é renovado de dois em dois dias, altura em que é adicionada a ração alimentar necessária. Os organismos em cultura são alimentados com *Pseudokirchneriella subcapitata*

(anteriormente designada por *Selenastrum capricornutum*) com uma ração diária de 3×10^5 células mL⁻¹ dia⁻¹.

2.1.3 *Eisenia andrei*

E. andrei é um oligoqueta ubíquo, largamente utilizado em ensaios toxicológicos (ISO, 2005; OECD 1984). As minhocas da espécie *Eisenia andrei* são uma importante componente de biomassa animal (invertebrados) existente na maioria dos solos, e têm um papel fundamental na promoção da qualidade do solo e na produtividade das plantas (Morgan *et al.*, 2002). Estes organismos apresentam um papel crucial na manutenção da estrutura e fertilidade dos solos, reciclagem de nutrientes, aumento do arejamento e drenagem, podendo constituir um importante componente na dieta das aves, répteis ou pequenos mamíferos (Allen, 2002). O elevado número de quimiorreceptores, concentrados no *prostomium* e no segmento anterior, os tubérculos, distribuídos na epiderme e os nervos terminais dos segmentos do corpo, contribuem para a capacidade que *Eisenia andrei* tem para reagir aos químicos existentes no ambiente (Reinecke *et al.*, 2002). O epitélio na região da boca aloja grupos de células sensoriais as quais podem ser estimuladas por substâncias químicas através do paladar. Estas células estão associadas à selecção de alimento, à detecção de condições ambientais desfavoráveis e de secreções mucosas de outras minhocas (Edwards e Lofty, 1977). Esta sensibilidade na resposta aos químicos, juntamente com a capacidade de locomoção, proporciona a *E. andrei* a capacidade de evitar *habitats* adversos (Stephenson *et al.*, 1997). Além disso, as minhocas são um importante elo na cadeia trófica terrestre, constituindo uma fonte de recurso para uma grande variedade de organismos, incluindo aves, mamíferos, répteis, anfíbios e insectos (Edwards e Lofty, 1977).

Em laboratório, as minhocas *Eisenia andrei* foram criadas numa cultura mantida em ambiente controlado (temperatura 20 ± 2 °C; fotoperíodo 16h^L:8h^E). Os organismos foram mantidos em caixas de plástico, numa mistura de turfa e estrume de cavalo, alimentados semanalmente com papa de aveia. O meio de cultura foi humedecido periodicamente para manter o teor de humidade. Os organismos utilizados nos testes foram minhocas adultas com um peso médio de 0,3 a 0,5g.

2.2. Químicos testados

No presente trabalho foram utilizados os princípios activos de pesticidas com taxas de utilização elevadas, no contexto português e europeu. Foram testados três compostos: (i) o herbicida sistémico **glifosato** (N-(fosfonometil)glicina), inserido no grupo químico dos aminoácidos fosfatados, cujo modo de acção assenta na inibição da síntese de determinados aminoácidos infestantes vegetais; (ii) o herbicida de contacto foliar **propanil** (3,4-dicloropropionanilida), que pertence à classe química das anilidas e actua através da inibição do transporte de electrões em espécies vegetais infestantes; (iii) o insecticida **metomil** (S-metil N- (metilcarbamoiloxil)) que integra o grupo químico dos carbamatos, químicos inibidores da actividade da enzima acetilcolinesterase. Os princípios activos do glifosato, propanil e metomil apresentavam níveis de pureza de 95%, 97% e 99,5%, respectivamente. O glifosato e o propanil foram cedidos para estudo pela empresa Sapec Agro®, Portugal e o metomil foi cedido para estudo pela empresa Makhteshim Agan®, Portugal. Independentemente da espécie utilizada, do tipo de ensaio aplicado ou do químico testado, as gamas de concentrações utilizadas obedeceram sempre a diluições geométricas, a partir de uma solução *stock* preparada por dissolução dos compostos, em solvente adequado. As soluções *stock* foram preparadas imediatamente antes da sua utilização em cada ensaio. No caso do teste da toxicidade do glifosato em *D. magna*, a dissolução foi feita em ASTM, de forma a assegurar o equilíbrio osmótico dos organismos nas concentrações mais elevadas do teste (concentrações com maior percentagem volumétrica de solução *stock* relativamente à percentagem de meio de cultura ASTM, também usado como controlo). Nos ensaios com a microalga *P. subcapitata* e com *E. andrei*, o glifosato foi dissolvido em água destilada para preparar a solução *stock*. Nos ensaios de toxicidade aguda de propanil com *Daphnia*, a solução *stock* foi também preparada dissolvendo propanil em ASTM. No caso deste composto em particular e dada a sua difícil solubilização em água, a solução foi preparada na véspera da sua utilização e deixada a agitar, no escuro, durante cerca de 12 horas. Ainda relativamente ao propanil, nos ensaios de toxicidade com *E. andrei*, uma vez que foi necessário testar concentrações bastante elevadas de propanil que ultrapassavam em larga escala o limite de solubilidade do químico em água (a 20C° é de 225 mg L⁻¹; <http://www.eu-footprint.org>), foi necessário recorrer à utilização de acetona, como solvente, para facilitar o estabelecimento dos

tratamentos de teste. Assim, foram preparadas tantas soluções *stock* quantas as concentrações de teste, tendo em conta um volume de aplicação desta solução no solo de teste de 1 mL por réplica – foram, portanto, pesadas as quantidades apropriadas de propanil por tratamento (3 réplicas) e dissolvidas em 4 mL de acetona. No caso do metomil, para os ensaios com os três organismos, a dissolução do composto foi feita em água destilada. No caso da *Daphnia*, as concentrações de metomil a testar eram muitas baixas sendo adicionados volumes grandes de ASTM, assegurando assim o equilíbrio osmótico, dado que o volume da solução adicionado foi muito pequeno.

Tabela 1. Concentrações nominais finais utilizadas nos testes com as três espécies (usadas para a determinação dos valores de CE₅₀ e LOEC). De modo a poder comparar valores com a bibliografia as concentrações nos testes de evitamento de *E. andrei*, apresentam-se em mg Kg⁻¹ e em Kg ha⁻¹.

Concentrações do princípio activo		
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
Metomil	mg L ⁻¹	62,5; 78,1; 97,7; 122; 153; 191; 238
Glifosato	mg L ⁻¹	61,5; 65,5; 81,9; 102; 160; 200
Propanil	µg L ⁻¹	20,7; 24,9; 29,9; 35,8; 43,0; 51,6; 61,9
<i>Daphnia magna</i>		
Metomil	µg L ⁻¹	15,1; 18,1; 22,7; 26,0; 31,3; 38,5; 45,0
Glifosato	mg L ⁻¹	até 2000
Propanil	mg L ⁻¹	1,19; 1,49; 1,87; 2,34; 2,92; 3,65; 4,45
<i>Eisenia andrei</i>		
Metomil	mg Kg ⁻¹	2,19; 3,51; 5,62; 8,98; 14,4; 23,0
	Kg ha ⁻¹	0,39; 0,64; 1,02; 1,63; 2,61; 4,18
Glifosato	mg Kg ⁻¹	6,15; 9,22; 13,8; 20,7; 31,1; 46,7
	Kg ha ⁻¹	1,12; 1,68; 2,51; 3,77; 5,66; 8,49
Propanil	mg Kg ⁻¹	2,2; 3,6; 5,7; 9,2; 14,6; 23,4; 37,5; 60,0
	Kg ha ⁻¹	0,4; 0,7; 1,0; 1,7; 2,7; 4,3; 6,8; 10,9

2.3. Testes ecotoxicológicos

2.3.1. *Pseudokirchneriella subcapitata*

Os testes de inibição de crescimento algal têm sido largamente utilizados para avaliação ecotoxicológica, em sistemas aquáticos, dos efeitos de pesticidas e outros químicos potencialmente tóxicos, uma vez que são de curta duração e baixos custos (OECD, 2006). No entanto, as espécies de algas verdes utilizadas nos testes podem apresentar diferentes valores óptimos de crescimento, o que condiciona a escolha da espécie e a metodologia específica usada em cada teste. *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma das espécies mais recomendadas para o efeito (OECD, 2006). A resposta das algas no teste é avaliada em função da comparação da inibição de crescimento nas diferentes concentrações de tóxico, relativamente ao crescimento observado no tratamento controlo.

A preparação e início do teste decorreram sob condições de assepsia. Foi utilizado um volume final de teste de 40 mL, em frascos Erlenmeyer, e foram preparadas 3 réplicas por tratamento (controlo e concentrações de pesticida) (*vide* Figura 1). O teste foi iniciado com a preparação das soluções de teste (controlo e concentrações de cada um dos princípios activos, *vide* Tabela 1). Seguidamente, procedeu-se à inoculação das soluções de teste com a alga verde. Para tal, foi retirado um inoculo (cerca de 200 mL) de uma cultura que se encontrava em fase exponencial de crescimento algal. A densidade celular do inoculo foi medida espectrofotometricamente ($\lambda=440\text{nm}$), de forma a estimar o volume necessário a inocular nas soluções de teste para estabelecer uma densidade celular inicial de 1×10^4 células mL^{-1} . O teste foi mantido numa câmara de incubação (F10.000 EDTU model) com agitação contínua (GFL 3015) de 100 r.p.m., com um fotoperíodo de $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{E}}$ ($43\text{-}46 \mu\text{mol quantum}^{-2}\text{s}^{-1}$, abastecido com luz fluorescente branca) e temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 1. Ilustração do procedimento de execução de um teste agudo com *P. subcapitata*.

Os procedimentos padrão relativos aos testes de inibição de crescimento algal recomendam que os testes terminem após 72 horas de incubação, sob condições de luminosidade contínua. No presente trabalho, e dada a existência de fotoperíodo, os ensaios terminaram após um período de exposição de 96 horas. A contagem da densidade celular, no fim do ensaio, foi realizada em câmaras de *Neubauer*, com o auxílio de um microscópio óptico. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de crescimento algal, relativamente ao crescimento observado no controlo (proporção entre o número de células contadas no controlo e o número de células contadas em cada tratamento, face à densidade celular inicial). Os dados foram, então, objecto de transformação *Probit* (Finney, 1971), tendo sido estimados os valores de CE_{50} (valor da concentração testada para a qual ocorreu 50% de inibição de crescimento algal) e respectivos intervalos de confiança a 95%, para cada princípio activo testado.

2.3.2. *Daphnia magna*

Os testes agudos de imobilização consistem na exposição de *Daphnia* sp. a uma série de concentrações da substância a testar para avaliar os seus efeitos sobre a mobilidade/mortalidade do organismo. Devem ser usadas no mínimo 5 concentrações, em que a concentração mais elevada deve preferencialmente resultar em 100% de imobilização, de modo a que a curva dose-resposta abranja todas as gamas de resposta possíveis (OECD, 2004). Para a realização dos testes agudos, foi utilizada a espécie *Daphnia magna* (clone A *sensu* Baird *et al.*, 1989) e foram seguidas as orientações

definidas em diversos protocolos padronizados (ISO, 1996; ASTM, 1980; OECD, 2004). As condições de incubação dos testes foram as já previamente descritas para as culturas dos organismos. Em todos os testes foram utilizados neonatos nascidos entre a 3^a e a 5^a geração na cultura, há menos de 24 horas (Baird *et al.*, 1989; OECD, 2004). Nos testes realizados no presente estudo, *D magna* foi exposta a várias concentrações dos diferentes princípios activos em estudo (propanil, metomil e glifosato). Foi ainda utilizado um controlo negativo, consistindo numa solução de ASTM sem adição de pesticida (*vide* Tabela 1). As soluções teste foram preparadas imediatamente antes da realização dos testes através da diluição da solução *stock* (*vide* “2.2. Químicos testados”, para mais considerações sobre a preparação das soluções *stock*), para obtenção das concentrações definidas. Os testes decorreram em frascos de vidro, contendo 50 mL de solução de teste, tendo sido estabelecidas 4 réplicas por tratamento (*vide* Figura 2). O oxigénio dissolvido e o pH foram monitorizados no início e no fim dos testes para fins de validação (OECD, 2004).



Figura 2. Ilustração de todos os tratamentos de um teste agudo de *D. magna*.

Ao fim de 48 horas, procedeu-se à observação de todas as réplicas, contabilizando-se o número de organismos imobilizados por tratamento, para posterior determinação do valor de CE₅₀. Para estimar os valores de CE₅₀ relativos à imobilização/mortalidade dos organismos, e os respectivos intervalos de confiança a 95%, após um período de exposição de 48 horas, foi usada a transformação *Probit* (Finney, 1971).

2.3.3. *Eisenia andrei*

Os testes de evitamento com *Eisenia andrei* estão classificados como testes de avaliação de efeitos comportamentais sub-letais, de fácil e rápida execução (ISO 2005, OECD 1984). Decorrem ao longo de 48 horas, período no qual os organismos são expostos a solos com diferentes graus de contaminação. Os testes de evitamento são testes duais em que se avalia a distribuição espacial de *E. andrei* face a dois solos (contaminado e não contaminado). Assim, o objectivo principal deste tipo de ensaios é avaliar se os organismos se encontram distribuídos ao acaso entre o solo contaminado e o solo não contaminado ou se, pelo contrário, eles evitaram o solo contaminado (Hund-Rinke e Wiechening, 2001; Yeardeley *et al.*, 1996; ISO 2005).

Os testes de evitamento para os diferentes princípios activos foram realizados em caixas de plástico (área=425 cm²), seguindo as recomendações do protocolo ISO 17512-1 (ISO, 2005). Essas caixas foram divididas em 2 compartimentos com uma zona separação de cartão amovível (*vide* Figura 3). O solo controlo (Standart LUFA 2.2, *Agricultural Research Centre, Speyer, Germany*) foi colocado num dos compartimentos da caixa (200 g). No outro compartimento da caixa, foi adicionado solo LUFA 2.2 (200 g) contaminado com diferentes concentrações do químico a testar (*vide* Tabela 1). Antes de juntar os organismos às caixas de teste, a humidade do solo foi ajustada para 40% da capacidade de retenção de água máxima desse solo, com água destilada. No caso do metomil e do glifosato, o volume/massa de água destilada a adicionar foi utilizado para preparar as soluções teste para cada uma das concentrações a testar, logo, a contaminação do solo foi feita, aproveitando o procedimento de ajuste da humidade do solo. No caso do propanil, o ajuste da humidade do solo e a contaminação ocorreram separadamente (*vide* “2.2. Químicos testados”). Em cada tratamento foram usados 30 organismos adultos, com clitelo desenvolvido, com peso entre 0,3 e 0,6g e distribuídos por 3 réplicas (10 por réplica). Deu-se início aos testes após a remoção do separador de cartão e a colocação dos organismos na linha de separação dos 2 solos (*vide* Figura 3A). No sentido de evitar eventuais fugas dos organismos, foi aplicado um filme plástico a vedar cada recipiente de teste, onde foram feitos orifícios de modo a facilitar as trocas gasosas.

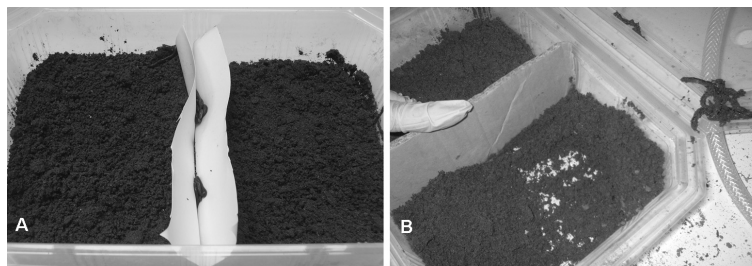


Figura 3. Ilustração representativa do início e do fim do teste de evitamento com *Eisenia andrei*. (Antunes *et al.*, 2008)

Os organismos foram expostos aos solos durante 48 horas sobre as mesmas condições ambientais acima descritas para a cultura de *Eisenia andrei*. No fim do ensaio, o separador de cartão foi reintroduzido na posição marcada e os indivíduos presentes em cada compartimento (solo contaminado e solo controlo) foram contabilizados (*vide* Figura 3B). Os organismos que se encontravam sobre a linha separadora dos solos foram considerados como estando presentes em ambos os solos (0,5 indivíduos/solo), independentemente da sua posição relativa em cada lado da câmara. Os resultados foram expressos sob a forma de resposta net (do inglês: *net response*), variando entre -1 e 1 (Antunes *et al.*, 2008):

$$\text{Resposta net} = (C - T) / N$$

C- número de indivíduos no solo controlo, T- número de indivíduos no solo contaminado; N- número total de indivíduos sobreviventes.

Os valores positivos obtidos com a aplicação da fórmula representam evitamento dos organismos em relação ao solo de contaminado, enquanto que, os valores neutros ou negativos representam indiferença ou preferência pelo solo contaminado, respectivamente. A análise de resultados foi feita segundo o proposto por Hund-Rinke e Wiechering (2001) e recomendado pelo protocolo padronizado (ISO, 2005), ou seja, foi definido que as funções do solo, enquanto *habitat*, ficam comprometidas quando mais que 80% dos organismos evita o solo contaminado. Foi efectuado um teste t de uma amostra ($p < 0,05$) para avaliar as diferenças estatísticas entre os valores médios de resposta net obtidos para as várias concentrações testadas, relativamente a zero, em que zero significa que não há nem preferência nem evitamento dos organismos.

3. Resultados

3.1. Teste de inibição de crescimento algal - *Pseudokirchneriella subcapitata*

Os valores de CE_{50} (96h) e os respectivos intervalos de confiança de 95%, relativos à inibição de crescimento algal de *P. subcapitata*, para os princípios activos avaliados, estão representados na Figura 4. Assim, pode observar-se que os valores obtidos para os herbicidas, propanil e glifosato, foram de $0,031 \text{ mg L}^{-1}$ (IC95%: $0,024\text{-}0,037 \text{ mg L}^{-1}$) e 129 mg L^{-1} (IC95%: $108\text{-}158 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. No caso do insecticida metomil, o valor de toxicidade aguda encontrado foi de 108 mg L^{-1} (IC95%: $87\text{-}126 \text{ mg L}^{-1}$). Os valores obtidos para os dois herbicidas, propanil e glifosato, apresentaram ordens de grandeza muito distintas, sendo o valor de CE_{50} encontrado para o glifosato aproximadamente 4 ordens de grandeza superior ao valor observado para o propanil. Em relação aos valores de CE_{50} obtidos para o metomil e glifosato pode observar-se que estes químicos apresentam toxicidades semelhantes. *P. subcapitata* apresentou maior sensibilidade ao princípio activo propanil, registando-se um valor de toxicidade bastante elevado $CE_{50}=0,031 \text{ mg L}^{-1}$. Para os princípios activos metomil e glifosato, verificou-se que os valores de CE_{50} são elevados (superiores ao limite definido a partir do qual não há efeitos de toxicidade 100 mg L^{-1}) (OECD, 2006), apresentando assim uma baixa toxicidade para a espécie em questão.

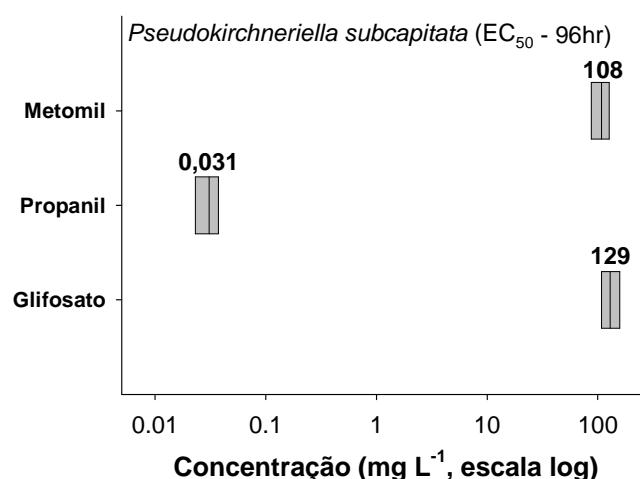


Figura 4. Valores de CE_{50} (96h) para *P. subcapitata* e respectivos intervalos de confiança a 95%, quando exposta aos princípios activos metomil, propanil e glifosato.

3.2. Teste de imobilização - *Daphnia magna*

Os valores de CE_{50} (48h) referentes à toxicidade aguda dos princípios activos metomil, propanil e glifosato para *D. magna*, bem como os respectivos intervalos de confiança de 95% estão indicados na figura 5. Os valores de toxicidade aguda para os princípios activos metomil e propanil registados foram: 0,021 mg L⁻¹ (IC95%: 0,019-0,023 mg L⁻¹) e 2,1 mg L⁻¹ (IC95%: 1,8-2,5 mg L⁻¹), respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que a toxicidade destes dois princípios activos é bastante elevada, apesar do valor de CE_{50} para o propanil ser aproximadamente duas ordens de grandeza superior ao valor obtido para o metomil. *D. magna* apresentou maior sensibilidade ao insecticida metomil, apresentando um valor de CE_{50} muito baixo (0,021 mg L⁻¹). Relativamente ao princípio activo glifosato, foram testadas concentrações até 2000 mg L⁻¹ e não se observaram quaisquer efeitos relevantes na imobilização e/ou mortalidade dos organismos teste. Esta concentração é muito superior ao valor a partir do qual, geralmente, se assume não haver toxicidade (100 mg L⁻¹) (OECD, 2004). Deste modo, poderá afirmar-se que o glifosato não apresenta toxicidade significativa para *D. magna*.

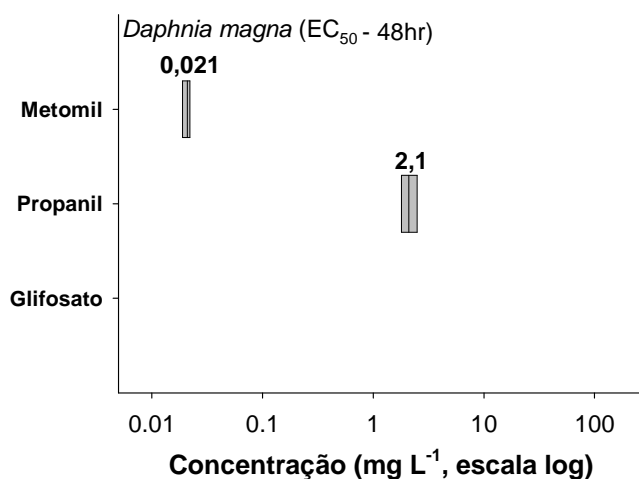


Figura 5. Valores de CE_{50} (48h) para *Daphnia magna*, e respectivos intervalos de confiança de 95%, quando exposta aos princípios activos metomil, propanil e glifosato.

3.3 Teste de evitamento - *Eisenia andrei*

Os resultados da *resposta de evitamento net de Eisenia andrei* aos diferentes princípios activos são apresentados nas figuras 6, 7 e 8. Os valores positivos de resposta net representam uma resposta de evitamento dos organismos ao solo contaminado, enquanto que valores neutros ou negativos traduzem indiferença ou preferência pelo solo contaminado. De modo a avaliar se as funções do solo se encontram comprometidas, foi ainda utilizada uma medida de avaliação proposta por Hund-Rinke e Wiechering (2001), segundo a qual para um evitamento do solo contaminado superior a 80% (correspondente a uma resposta net superior a 0,6) se considera que o *habitat* funcional desse solo se encontra comprometido. No caso do princípio activo metomil, *E. andrei* evitou o solo contaminado em todas as concentrações testadas. No entanto, a partir da concentração de 1,02 Kg ha⁻¹, esse evitamento foi significativo ($t=10,00$; $p=0,00$), dado que mais de 80% organismos evitaram o solo contaminado, indicando assim que o *habitat* funcional do solo passou a estar comprometido para *E. andrei*. Para o princípio activo propanil, observou-se o mesmo tipo de resposta do registado para o metomil, na medida em que para todas as concentrações testadas observou o evitamento do solo contaminado. No entanto, em nenhuma das concentrações este evitamento foi significativo. No presente trabalho foram testadas concentrações até 10,9 Kg ha⁻¹ para garantir uma margem de segurança em relação aos valores da taxa de aplicação. As taxas de aplicação apresentadas por Tomlin (2001) estão entre 2,5 e 5 Kg ha⁻¹ sendo assim, supostamente concentrações de propanil na ordem dos 10,9 Kg ha⁻¹ não ocorrem no meio ambiente. O perfil de resposta de evitamento de *E. andrei* ao solo contaminado com o princípio activo glifosato não é linear. Nas primeiras concentrações testadas (até aproximadamente 2,5 Kg ha⁻¹ de glifosato) os organismos apresentaram evitamento ao solo contaminado. Nas concentrações seguintes foi registada uma preferência dos organismos pelo solo contaminado uma concentração de 8,49 Kg ha⁻¹. Este tipo de comportamento mostra que não há qualquer tipo de relação entre o aumento de concentração e a resposta de *Eisenia andrei* para o princípio activo glifosato. De acordo com os perfis de resposta net observados para os 3 princípios activos, poderá dizer-se que *E. andrei* apresentou maior sensibilidade ao princípio activo metomil.

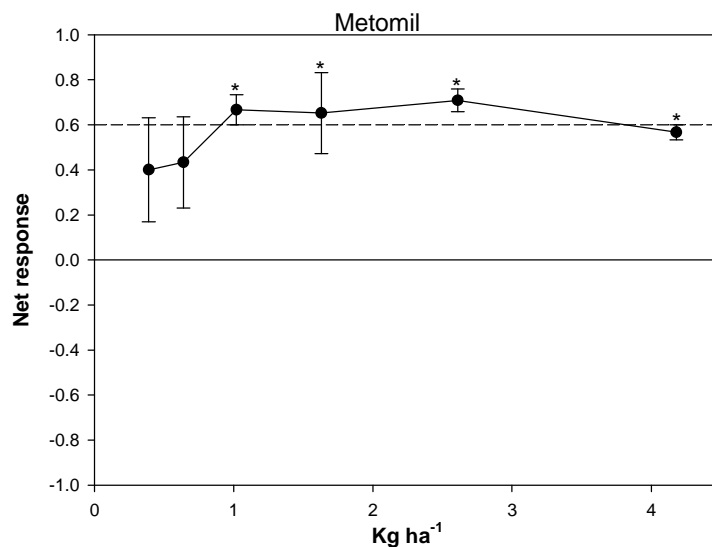


Figura 6. Resposta net (net response em Inglês) de *E. andrei* exposta às combinações de solo (LUFA 2.2) contaminado com metomil e não contaminado (controlo). As barras correspondem ao erro padrão relativamente à média calculada. Concentrações para as quais se registou um evitamento significativo assinaladas com (*) (teste de t, $p < 0,05$).

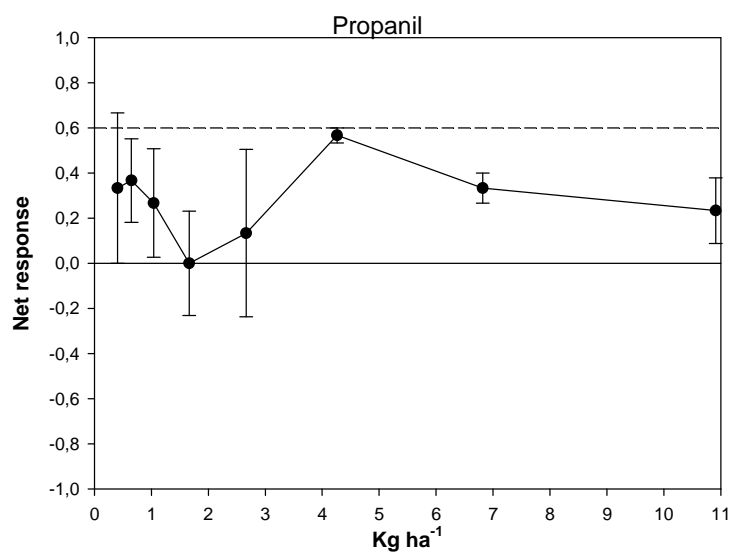


Figura 7. Resposta net (net response em Inglês) de *E. andrei* exposta às combinações de solo (LUFA 2.2) contaminado com propanil e não contaminado (controlo). As barras correspondem ao erro padrão relativamente à média calculada. Concentrações para as quais se registou um evitamento significativo assinaladas com (*) (teste de t, $p < 0,05$).

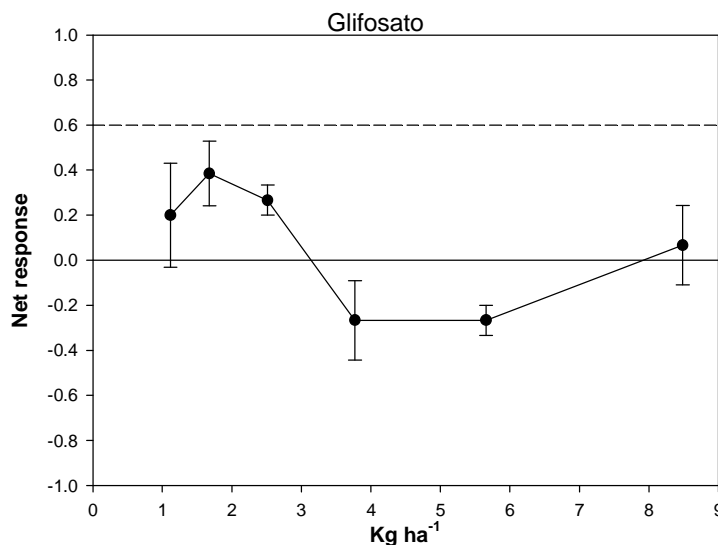


Figura 8. Resposta net (net response em Inglês) de *E. andrei* exposta às combinações de solo (LUFA 2.2) contaminado com glifosato e não contaminado (controlo). As barras correspondem ao erro padrão relativamente à média calculada. Concentrações para as quais se registou um evitamento significativo assinaladas com (*) (teste de t, $p < 0,05$).

4. Discussão

Ao longo do presente trabalho, foi possível constatar que a informação ecotoxicológica disponível para os princípios activos metomil, propanil e glifosato, sobretudo para espécies não alvo, era bastante reduzida (*vide* tabelas 1, 2 e 3 na Introdução Geral). Perante este facto o presente estudo foi uma contribuição significativa na obtenção de dados ecotoxicológicos, com vista à determinação de taxas de aplicação protectoras para os ecossistemas. A legislação europeia relativa à colocação dos pesticidas no mercado obriga que os testes ecotoxicológicos requeridos para registar novas substâncias químicas sejam feitos apenas para os princípios activos (Directiva 414/91/CEE). Para os produtos formulados não há obrigatoriedade em realizar uma avaliação ecotoxicológica, existindo apenas uma recomendação (CE, 1991). Para os princípios activos que têm vindo a ser revistos pela União Europeia (e.g. glifosato) existe a obrigatoriedade de efectuar testes ecotoxicológicos para espécies não alvo (CE, 1991) e, dentro de pouco tempo, todos os princípios activos (e.g. metomil e propanil) deverão ser alvo do mesmo processo de revisão.

Os herbicidas ao atingirem o **compartimento aquático** podem afectar as comunidades fitoplanctónicas, por inibição do crescimento algal, com consequente redução dos recursos alimentares para os níveis tróficos superiores (zooplâncton e peixes) (Gómez de Barreda *et al.*, 2004). O **propanil** é um herbicida de superfície ou de contacto foliar (Tomlin, 2001). É específico e selectivo no seu modo de acção, actuando ao nível da fotossíntese, inibindo o transporte de electrões, ao nível do receptor do fotossistema II nos cloroplastos (Mitsou *et al.*, 2006). Adicionalmente, adsorve-se moderadamente à matéria orgânica ($K_{oc}=400 \text{ mg L}^{-1}$; <http://www.eu-footprint.org>) o que aumenta a possibilidade de contaminação das massas de águas confinantes com as culturas por escorrências superficiais (Kegley *et al.*, 2007). Vários estudos têm registado resíduos de propanil em águas superficiais (Albanis *et al.*, 1998; Cerejeira *et al.*, 2003). A título de exemplo, Gómez de Barreda *et al.* (2004) registou concentrações de propanil próximas de $0,028 \text{ mg L}^{-1}$ nos canais de drenagem de canteiros de arroz inundados, logo após o período de pulverização. A proximidade das concentrações ambientais, do valor de CE_{50} registado no presente estudo para *P. subcapitata* ($0,031 \text{ mg L}^{-1}$), assim como, da gama de concentrações de propanil capaz de inibir de forma significativa o crescimento de algas do género *Scenedesmus* ($0,15\text{-}2,0 \text{ mg L}^{-1}$) (Gómez de Barreda *et al.*, 2004) justifica as preocupações relativas à aplicação de pesticidas com este princípio activo. *P. subcapitata* em particular é uma espécie que apresenta diversas características que facilitam a absorção de químicos tais como: relação superfície-volume elevada, elevado conteúdo lipídico e elevada capacidade de absorção (Kent e Caux, 1995). Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que *P. subcapitata* foi consideravelmente mais sensível do que *D. magna*, contudo a toxicidade do propanil para esta espécie de cladóceros continua a ser elevada, ocorrendo, uma vez mais em concentrações ecologicamente relevantes ($CE_{50}=2,1 \text{ mg L}^{-1}$). Pereira *et al* (2000) havia já demonstrado que a toxicidade aguda do propanil para microalgas era superior à registada para organismos zooplancónicos e peixes. O valor de CE_{50} , registado neste estudo foi contudo bastante inferior ao que já tinha sido determinado por Villarroel *et al* (2003) (CE_{50} de $5,01 \text{ mg L}^{-1}$), o que pode resultar de diferentes sensibilidades dos clones utilizados nos ensaios. Segundo Hanazato (2001) efeitos agudos de contaminantes induzidos nos consumidores primários da cadeia trófica podem provocar profundas alterações no ecossistema, devido ao seu papel central na transferência de massa e energia para níveis tróficos superiores. Em *D. magna* a entrada directa do químico

através da superfície corporal é uma das formas de provocar efeitos tóxicos (Hanazato, 2001). Esta terá sido de facto a principal via de exposição neste estudo, na medida em que durante os ensaios agudos, ainda que os organismos filtrem água, não são alimentados durante o período de exposição. Contrariamente ao que tem sido observado para outras substâncias químicas, Pereira *et al.*, (2007) verificaram que *D. magna* é mais sensível ao propanil ($CE_{50}=3,55 \text{ mg L}^{-1}$) do que diferentes clones de *D. longispina* ($CE_{50}=6,53 \text{ mg L}^{-1}$; $7,51 \text{ mg L}^{-1}$; $6,72 \text{ mg L}^{-1}$). O tamanho mais pequeno desta última espécie e consequentemente a maior relação superfície/volume (Liluis *et al.*, 1995) permitem que a superfície de contacto do organismo esteja mais em contacto com o químico.

O outro herbicida estudado neste trabalho foi o **glifosato**, que se caracteriza por ser não selectivo, sistémico, apresentar baixa persistência e bioacumulação no meio ambiente e com um volume de vendas dos mais significativos devido à sua eficácia no controlo de infestantes (Giesy *et al.*, 2000). O seu modo de acção consiste na inibição da síntese de aminoácidos aromáticos, bem como o decréscimo das taxas da síntese de proteínas em alguns microrganismos (e.g. fungos e bactérias) e clorofila nas plantas (Devine *et al.*, 1993). O glifosato é altamente polar e pouco lipofílico o que poderá constituir um dos principais motivos pelo qual este composto apresentou baixa toxicidade para a alga verde unicelular *P. subcapitata* ($CE_{50}=129 \text{ mg L}^{-1}$). Contudo, este valor foi muito diferente dos registados por Tomlin (2001) ($CE_{50}=485 \text{ mg L}^{-1}$) e por Cedergreen e Streibig (2005) ($CE_{50}=270 \text{ mg L}^{-1}$), para a mesma espécie. No entanto os mesmos autores, registaram um valor de $CE_{50}=46,9 \text{ mg L}^{-1}$ para a macrófita *Lemna minor* quando exposta ao glifosato, demonstrando desta forma que dada a maior sensibilidade desta espécie, o herbicida em causa poderá ter efeitos nefastos na produtividade primária dos ecossistemas de água doce. Esta diferença de sensibilidades ao glifosato entre a planta aquática e a alga pode ser justificada pelo facto de a via de entrada deste herbicida nas espécies vegetais ser através do sistema radicular, apenas existente na macrófita. Deste modo, reconhece-se a importância de incluir espécies de macrófitas em estudos de análise de risco preventiva, situação já prevista na Directiva 91/414/CEE. Para avaliar a toxicidade em *D. magna*, foram testadas concentrações até 2000 mg L^{-1} do princípio activo glifosato, não tendo sido registados valores de toxicidade. Na tabela 3 (*vide* Introdução Geral) pode observar-se que Tomlin (2001) apresenta um valor de $CE_{50}=780 \text{ mg L}^{-1}$, concentração bastante elevada e com reduzida relevância ecológica, demonstrando que *D. magna* não apresenta

sensibilidade a este químico. No entanto, é necessário relembrar que o modo de acção do glifosato consiste na inibição da enzima EPSPS (do inglês: *5-endpyruvyl shikimate-3-P-synthetase*) que catalisa uma etapa importante na via metabólica do ácido chiquimato para a biosíntese de aminoácidos aromáticos necessários para o desenvolvimento das plantas. A via metabólica deste ácido não foi ainda encontrada nos animais, o que explica a baixa toxicidade registada confirmada para *D. magna*. (Solomon e Thompson, 2003).

O **metomil**, mais um dos princípios activos testados neste trabalho, é insecticida de contacto, em que a principal via de entrada é a superfície corporal do organismo. É um pesticida selectivo, não bioacumulável e apresenta baixa persistência no meio ambiente (Stark e Walter, 1995), actuando especificamente na inibição da actividade catalítica da enzima acetilcolinesterase (AChE). (Hutson e Roberts, 1985). O metomil é frequentemente encontrado em águas superficiais, nomeadamente quando a sua aplicação é feita por aspersão em culturas próximas de massas de água (WHO, 1996). Deste modo, os organismos que habitam as massas de água próximas de áreas agrícolas onde o químico é aplicado, podem sofrer efeitos nefastos podendo mesmo ocorrer taxas de mortalidade significativas, nomeadamente em organismos não alvo (e.g. *D. magna*) (Van Wijngaarden *et al.*, 2005). O valor de CE_{50} obtido para *D. magna* neste trabalho foi de $0,021 \text{ mg L}^{-1}$, confirmando a elevada toxicidade aguda do metomil para cladóceros, já demonstrada em outros trabalhos (*vide* tabela 1; Introdução Geral). O valor de EC_{50} obtido foi sensivelmente mais baixo do que os valores recolhidos na bibliografia: i) WHO (1996) apresenta um $CE_{50}=0,032 \text{ mg L}^{-1}$; ii) Tomlin (2001) apresenta um valor semelhante de $0,0317 \text{ mg L}^{-1}$; iii) Fernandez-Alba *et al.*, (2002) obteve um $CE_{50}=0,0287 \text{ mg L}^{-1}$ e, iv) Pereira *et al.*, (2007) registaram um valor de CE_{50} de $0,0242 \text{ mg L}^{-1}$, em exposições de *D. magna* a uma das formulações comerciais de metomil. No entanto, e segundo a Direcção Geral de Protecção de Colheitas o valor de CE_{50} para o metomil, para *D. magna*, estabelecido a nível da União Europeia é de $0,017 \text{ mg L}^{-1}$. A enzima AChE envolvida no modo de acção deste insecticida só existe nos animais, o que pode explicar a reduzida toxicidade observada em *P. subcapitata*. No presente trabalho foi obtido um valor de CE_{50} superior a 100 mg L^{-1} (108 mg L^{-1}) para *P. subcapitata*, valor a partir do qual se convencionou considerar residuais os efeitos tóxicos resultantes da exposição dos organismos a xenobióticos (OECD, 2006). O valor de toxicidade aguda obtido neste trabalho apresenta-se na mesma ordem de grandeza do valor estabelecido a nível da União

Europeia para *S. capricornutum* ($CE_{50} \geq 100 \text{ mg L}^{-1}$) (D.G.P.C, 2009) (*vide* tabela 1; Introdução Geral). Também para *S. capricornutum*, vários autores obtiveram valores de toxicidade aguda (CE_{50}) na ordem dos 60 mg L^{-1} (FAO, 2002; Douglas e Handley, 1988; Fernandez Alba *et al.*, 2002).

Relativamente ao **compartimento terrestre**, *Eisenia andrei* apresenta características que tornam esta espécie um excelente organismo teste para avaliar a toxicidade de químicos no solo (Arnaud *et al.*, 2000). Segundo Tomlin (1992), a presença de pesticidas ou outros químicos no solo podem alterar o comportamento das minhocas provocando alterações na estrutura e funcionamento do ecossistema terrestre. Neste trabalho, e especificamente no caso do propanil para a maioria das concentrações testadas os organismos não provocaram evitamento dos solos contaminados, o mesmo se tendo registado para o glifosato, o outro herbicida testado. Tal facto era esperado pelo facto de o mecanismo de acção destes compostos estar muito relacionado com vias metabólicas exclusivas de plantas e algas. Contudo, e não obstante tal facto o propanil foi capaz de induzir uma resposta em *Daphnia magna*. A reduzida toxicidade do glifosato para *Eisenia andrei* vem corroborar a sugestão de Edwards e Bohlen, (1992), de acordo com os quais este herbicida tem reduzida toxicidade para o compartimento terrestre. No entanto esta constatação requer que se realizem ensaios com outras espécies terrestres. Em relação ao teste de evitamento com *E. andrei* exposta a diferentes concentrações de metomil as minhocas evitaram significativamente o solo contaminado em quase todas as concentrações testadas: $1,02 \text{ Kg ha}^{-1}$ ($t=10,00$; $p=0,00$); $1,63 \text{ Kg ha}^{-1}$ ($t=3,63$; $p=0,00$); $2,61 \text{ Kg ha}^{-1}$ ($t=13,97$; $p=0,00$) e $4,18 \text{ Kg ha}^{-1}$ ($t=17,00$; $p=0,00$). Contudo, na concentração mais elevada, a função de *habitat* do solo contaminado não se pode considerar que tenha estado comprometida, na medida em que o evitamento net foi inferior a 0,6. Em suma, parece que há uma inversão do comportamento de evitamento, do solo contaminado com metomil, por *Eisenia andrei*.

As taxas de aplicação do propanil, glifosato e do metomil são, respectivamente, $2,5\text{--}5 \text{ Kg ha}^{-1}$, $5,8 \text{ Kg ha}^{-1}$ e 1 Kg ha^{-1} (<http://www.eu-footprint.org>). As referidas taxas de aplicação foram largamente ultrapassadas nas concentrações testadas nos testes de evitamento. Sendo assim, não tendo havido evitamento do solo contaminado nas concentrações mais baixas pode afirmar-se com mais garantia que as taxas de aplicação

recomendadas para aplicar no Meio Ambiente, dos princípios activos estudados, não representam perigo para *E. andrei*.

Perante os resultados obtidos, para os princípios activos de três pesticidas e para diferentes espécies não alvo, tal como é exigido pela legislação europeia, há que ter em conta que os mesmos, podem ainda não ser suficientes dado que os princípios activos não são aplicados isoladamente no meio ambiente. Os pesticidas apresentam na sua constituição uma fracção do princípio activo e, formulantes e surfactantes que podem ser biológica ou quimicamente activos devendo por isso os pesticidas ser devidamente rotulados (Cox e Sorgan, 2006). Dos valores bibliográficos registados nas tabelas 1 e 2 (*vide* Introdução Geral), para o metomil e propanil, apenas se encontrou um registo de toxicidade para uma formulação comercial, Lannate e Stam Novel Flo 480®, respectivamente, e apresentam uma toxicidade inferior aos respectivos princípios activos. O glifosato é o químico para o qual se registaram mais dados ecotoxicológicos, no entanto, os valores de toxicidade registados apresentam discrepâncias, especialmente para as formulações comerciais, provavelmente por estas apresentarem na sua composição diferentes composições e/ou quantidades de formulantes (Cox e Sorgan, 2006). Everett e Dickerson (2003) registaram que formulações comerciais de glifosato apresentaram toxicidade 100 vezes superior ao princípio activo glifosato para protozoários ciliados; Garcia-Ortega *et al.*, (2006) reportam que uma formulação do insecticida protetamphos apresenta toxicidade 100 vezes superior para a flora microbiana dos sedimentos, em relação ao princípio activo propetamphos. Os estudos anteriormente referenciados demonstram que, por vezes, as formulações comerciais podem apresentar toxicidade mais elevada para os organismos que os princípios activos isolados. Os resultados acima referenciados são um alerta para o facto de ser necessário ou ser obrigatório na Directiva 91/414/EC efectuar estudos ecotoxicológicos às formulações comerciais e não ser restrito apenas aos princípios activos dos pesticidas.

5. Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem às empresas Makhteshim Agan® (Portugal), Sapec Agro® (Portugal) e Lactema (Portugal) por terem fornecido os princípios activos metomil, glifosato e propanil.

Referências Bibliográficas

- Albanis TA, Hela DG, Sakellianides TM e Konstantitou IK (1998). Monitoring of pesticides residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 823: 59-71.
- Allen HE (2002). Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants. SETAC, New York.
- Antunes SC, Castro BB, Pereira R e Gonçalves F (2008). Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. *Science of the Total Environment* 390: 387-395.
- Arnaud C, Saint-Denis M, Narbonne JF, Soler P e Ribera D (2000). Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology e Biochemistry* 32: 67-73.
- ASTM (1980). Standart practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E 729-80. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Baird DJ, Barber I, Bradeley M, Calow P Soares AMVM (1989). The Daphnia bioassay: a critique. *Hydrobiologia* 188/189: 403-406.
- CE (Comissão Europeia) (1991). Directiva 91/414/EEC do Conselho de 15 de Junho de 1991 relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L230 de 19.08.1991: 1-32.
- Cetin AK e Mert N (2006). Growth rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in cultures exposed to trifluralin. *Polish Journal of Environmental Studies* (15) 4: 631-633.
- Cedergreen e Streibig (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science* 61: 1152-1160.
- Cerejeira MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valério MJ, Silva A, Ferreira M e Silva-Fernandes AM (2003). Pesticides in Portuguese Surface and Ground Waters. *Water Resource* 37: 1055-1063.
- Cox C e Surgan M (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* 114 (12): 1803-1806.
- Deng HW e Lynch M (1996). Change of genetic architecture in response to sex. *Genetics* 143: 203-212.
- Devine MD, Duke SO e Fedtke C (1993). Herbicidal inhibition of photosynthetic electron transport. In: *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

- Douglas MT e Handley JW (1988). The algistatic activity of methomyl Technical. Huntingdon, United Kingdom, Huntingdon Research Centre (Unpublished report nº DPX-X1179-00620-06). (<http://www.inchem.org>).
- Edwards CA e Lofty JR (1977). *Biology of Earthworms*. Hasted, New York, NY. United States.
- Edwards C e Bohlen P (1992). The effects of toxics chemicals on earthworms. *Environmental Contamination and Toxicology* 125: 23-100.
- Elendt BP e Bias WR (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions of life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Resource* 24: 1157-1167.
- Everett KDE e Dickerson HW (2003). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena thermophila* tolerate glyphosate but not a commercial herbicidal formulation. *Bulletin Environmental Toxicology* 70: 731-738.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2002). *Specifications and evolutions for plant protection products, Methomyl*. The United Nations. (<http://fao.org>)
- Fernández -Alba AR, Hernando D, Agüera A, Cáceres J e Malato S (2002). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research* 36: 4255-4262.
- Finney DJ (1971). Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- García – Ortega S, Holliman PJ e Jones DL (2006). Toxicology and fate of Pestanal and commercial propetamphos formulation in river and estuarine sediment. *Science Total Environmental* 366: 826-836.
- Giesy JP, Dobson S e Solomon KR (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Review Environmental, *Contamination and Toxicology* 167: 35-120.
- Gómez de Barreda Ferraz D, Sabater C e Carrasco JM (2004). Effects of propanil, tebufenozide and mefenacet on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Chemosphere* 56: 315-320.
- Hazanato T (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112: 1-10.
- Hund-Rinke K e Wiechering H (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *Journal of Soils and Sediments* 1: 15-20.
- Huston DH e Roberts TR (1985). Insecticides- progress in pesticide biochemistry and toxicology. In: Insecticides. Editado por: Hutson DH, Roberts TR. Chichester: John Wiley e Sons. West Sussex.
- Islam M e Tanaka M (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystem including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48: 624-649.

- ISO 6341 (1996). Water quality: determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 17512-1 (2005). Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – test with earthworms (*Eisenia andrei*). Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.
- Kent RA e Caux PY (1995). Sublethal effects of insecticides fenitrothion on freshwater phytoplankton. *Canadian Journal of Botany* 73: 43-53.
- Kegley S, Hill B e Orme S (2007). PAN pesticides database. Pesticide Action Network, North America. San Francisco (<http://www.pesticideinfo.org>).
- Lampert W (2006). *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54: 607-620.
- Liluis H, Hastbacka T e Isomaa B (1995). A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology Chemistry* 14: 2085-2088.
- Mitsou K, Koulianou A, Lambropoulou D, Pappas P, Albanis T e Lekka M (2006). Growth rate effects of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere* 62: 275-284.
- Moore MT, Pierce JR, Milam CD, Farris JL e Winchester EL (1998). Responses of non-target aquatic organisms to aqueous Propanil exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 169-174.
- Morgan AJ, Evans M, Winters C, Gane M e Davies MS (2002). Assaying the effect of chemical ameliorants with earthworms and plants exposed to a heavily polluted metalliferous soil. *European Journal of Soil Biology* 38: 323-327.
- Newman MC, Ownby DR, Mézin LCA, Powell DC, Christensen TRL, Lerberg SB, Anderson B-A (2000). Applying species sensitivity-distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Ecotoxicology and Environmental Chemistry* 19(2): 508-515.
- OECD (1984). OECD guideline 207. Earthworms acute, toxicity tests. Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (1998). *Daphnia magna* reproduction test. Test guideline 211. Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2004). OECD guideline for testing of chemicals 202. *Daphnia* sp., acute immobilization test. Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris.

- OECD (2006). OECD guideline for the testing of chemicals 201. Freshwater Algal and Cyanobacteria Growth Inhibition. Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris.
- Pereira T, Cerejeira MJ e Espírito Santo J (2000). Use of microbiotest to compare the toxicity of water samples fortified with active ingredients and formulated pesticides. *Environment and Toxicology* 15: 401-405.
- Pereira JL, Mendes CD e Gonçalves F (2007). Short and long term responses of *Daphnia spp* to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicological Environmental Safety* 68: 386-396.
- Posthuma L, Sutter II GW, Trass TP (2002). General Introduction to Species Sensitivity Distributions. In Species Sensitivity Distribution in Ecotoxicology. Ed. By Leo Posthuma, Glenn W. Sutter II e Theo P. Trass. Lewis Publishers.
- Reinecke AJ, Maboeta MS, Vermeulen LA e Reinecke SA (2002). Assessment of lead nitrate and Mancozeb toxicity in Earthworms using the Avoidance response. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 779-786.
- Reynolds CS (1975). Interrelations of photosynthetic behavior and buoyancy regulation in a natural population of a blue green alga. *Freshwater Biology* 5: 323-338.
- Römbke J, Breure AM, Mulder C e Rutgers M (2005). Legislation and ecological quality assessment of soil: implementation of ecological indication systems in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 201-210.
- SETAC (1997). Technical issue paper - *Ecological Risk Assessment*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf LW, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW, Williams WM, 1996. Ecological risk assessment of Atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (1): 31-76.
- Solomon K e Thompson D (2003). Ecological Risk Assessment for Aquatic Organisms from Over-Water Uses of Glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6 (3): 283-324.
- Stark JD e Walter JF (1995) Neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. *Journal Agriculture Food Chemistry* 43: 507-512.
- Stein JR (1973). Handbook of Phycological Methods- Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, UK.
- Stephenson GL, Kaushik A, Kauskik NK, Solomon KR, Steele T e Scroggins RP (1997). Use of an avoidance –response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Sheppard SC, Bemdrigge JD, Holmstrup M e Posthuma L (Eds). Advances in earthworm ecotoxicology SETAC.

- Tomlin AD (1992). Behaviour as a source of earthworm susceptibility to ecotoxicants. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ e Heimbach F (Eds) *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercep, Andover.
- Tomlin CDS (2001). *The pesticide manual*. British Crop Protection Council, Surrey.
- USEPA (2002). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Environmental Protection Agency -821-R-02-013. *Office of Water*. Washington, D.C.
- Van Wijngaarden RPA, Brock TCM e van den Brink PJ (2005). Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 14: 355-380.
- Villarroel MJ, Sancho E, Fernando MD e Amadeu E (2003). Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857-864.
- Wetzel RG (1993). Limnologia (trad. MJ Boavida). Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Wheeler, JR, Grist, EPM, Leung, KMY, Morrit, DE, Crane, M (2002). Species sensitivity distributions (data and model choice). *Marine Pollution Bulletin* 45: 192-202.
- WHO (1996). Methomyl- Environmental Health Criteria, vol.178. Geneva: World Health Organization.
- Yeardley RB, Lazorchak JM e Gast LC (1996). The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 1532-1537.

Capítulo II

Evitamento de *Eisenia andrei*: resposta comportamental vs resposta bioquímica

CAPÍTULO II

Evitamento de *Eisenia andrei*: resposta comportamental versus resposta bioquímica

Resumo

A actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) representa o biomarcador neurotóxico mais usado para avaliar exposição a químicos anticolinérgicos, e os subsequentes efeitos no sistema nervoso. A inibição da actividade da enzima AChE é suficientemente sensível sendo afectada mesmo a baixas concentrações de carbamatos (e.g. metomil). Esta inibição provoca alterações na coordenação do sistema neuromuscular, o que por sua vez pode implicar alterações comportamentais. Deste modo, o presente estudo pretende perceber se existe uma relação entre os efeitos comportamentais (resposta de evitamento net) e bioquímicos (inibição da AChE) em *Eisenia andrei* quando exposta a solos contaminados com o princípio activo metomil. No ensaio comportamental foi observado evitamento significativo a partir da concentração de 5,62 mg Kg⁻¹ de metomil, mas com uma inversão do comportamento de evitamento do solo contaminado, na concentração mais elevada (23,0 mg Kg⁻¹). Relativamente ao ensaio da inibição da enzima AChE, verificou-se uma inibição significativa da enzima em todas as concentrações testadas. Este trabalho experimental evidencia a possibilidade da resposta de comportamento ser afectada pela inibição da enzima AChE. Tal facto pode comprometer a validade do teste de evitamento com *Eisenia*, sp., como um teste de rastreio para a avaliação da toxicidade de pesticidas com um modo de acção semelhante ao metomil,

Palavras-chave: Metomil, Evitamento, *E. andrei*, AChE

1. Introdução

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) tem demonstrado um interesse crescente na padronização de metodologias para avaliação dos efeitos dos pesticidas sobre a fauna do solo (OECD, 2000). Contudo, a grande questão em ecotoxicologia, coloca-se sobretudo em definir a que nível biológico se deve fazer as avaliações e que parâmetros devem ser avaliados para que a informação tenha qualidade e relevância ecológica para ser integrada no cálculo dos riscos. Os biomarcadores são considerados parâmetros de grande especificidade e sensibilidade, encontrando-se já adaptados a uma vasta gama de organismos (Livingstone, 1993). Os biomarcadores definem-se como sendo respostas biológicas específicas relacionadas com o metabolismo dos organismos, a desintoxicação e/ou a toxicidade induzida por contaminantes (Martín-Díaz *et al.*, 2004). Os biomarcadores têm um potencial para antecipar mudanças a níveis de organização biológica superiores (população, comunidade ou ecossistema), detectando rapidamente, nos organismos expostos aos pesticidas, alterações resultantes de situações de stress. Isto é, podem ser usados como sinais de alarme, fornecendo informação prévia para que se possam implementar num curto espaço de tempo, possíveis estratégias de remediação, evitando deste modo danos ambientais com consequências ecológicas mais graves (Martín-Díaz *et al.*, 2004).

As minhocas (e.g. *Eisenia* sp.) apresentam diversas características (e.g. comportamento, elevada biomassa, quimiorreceptores ao nível da epiderme) que as convertem em excelentes bioindicadores na avaliação da qualidade do solo (Arnaud, 2000; Reinecke *et al.*, 2002). Os pesticidas aplicados ao solo podem induzir a que estes organismos alterem o seu comportamento de forma a minimizarem a sua actual exposição (Tomlin, 1992). O desaparecimento ou migração das minhocas de solos contaminados pode ter consequências na estrutura e funcionamento do ecossistema terrestre, dado que estes organismos têm um papel crucial nas funções do solo (e.g. participação na decomposição da matéria orgânica, arejamento do solo, mineralização de nutrientes). Uma das maiores ameaças à qualidade dos solos reside na aplicação intencional de pesticidas, por vezes em doses excessivas para produção agrícola. Actualmente, a utilização de insecticidas carbamatos na agricultura têm vindo a aumentar, uma vez que se caracterizam como sendo fácil e rápida degradação no ambiente, e aparentemente não se acumulam em

organismos vivos nem ao longo da cadeia alimentar (Guilhermino *et al.*, 1996). No entanto, a toxicidade dos insecticidas pode não ser limitada ao local onde são aplicados, estes químicos podem ser transportados através de processos físicos (e.g. escorrências, lixiviação, drenagem, aspersão) para outros compartimentos ambientais afectando espécies não alvo (Deneer, 2000). O insecticida metomil (S-metil N- (metilcarbamoiloxil)) integra o grupo químico dos carbamatos cujo modo de acção é baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Verharr *et al.*, 1992). O metomil é um insecticida de contacto sendo a superfície corporal do organismo a principal via de entrada, no entanto a ingestão é outra via de entrada nos organismos (Tomlin, 2001). A inibição da enzima AChE tem sido sucessivamente usada como biomarcador para monitorizar os efeitos tóxicos dos pesticidas organofosforados e carbamatos (Zinkl *et al.*, 1991) em organismos terrestres (e.g. Detra e Collins, 1991), aquáticos (e.g. Day e Scott, 1990) e marinhos (e.g. Martinez- Tabche *et al.*, 1992). O principal efeito tóxico dos carbamatos resulta da inibição da enzima AChE causando disrupções nas funções nervosas (Chambers *et al.*, 2004). A enzima AChE é uma enzima chave da normal fisiologia das sinapses colinérgicas do sistema nervoso e junções neuromusculares dos organismos. A eficiente hidrólise da acetilcolina, em colina mais acetato, com limpeza das fendas sinápticas, é fundamental para evitar a sobestimulação dos receptores de nicotina e muscarina, dos órgãos controlados pelo sistema nervoso autónomo e dos músculos esqueléticos e dos receptores colinérgicos do sistema nervoso central. As consequências da inibição da AChE variam em função das sinapses afectadas (Thompson e Richardson, 2004). No caso particular de *Eisenia* sp., ficou demonstrado que a inibição da acetilcolinesterase interrompe a coordenação entre o sistema nervoso e o sistema muscular originando descoordenação muscular (Rao *et al.*, 2003) o que pode levar a alterações na capacidade das minhocas evitarem ambientes contaminados.

O presente trabalho teve como objectivo avaliar se o comportamento evitamento de *Eisenia andrei* resultante de exposições sub-letais a solos contaminados com o insecticida metomil, era de algum modo afectado pela inibição da enzima acetilcolinesterase, e subsequentes efeitos na coordenação neuromuscular. Para o efeito foi levado a cabo um ensaio de evitamento com *Eisenia andrei*, seguindo procedimentos padronizados (ISO, 2005) e a avaliação do parâmetro comportamental foi integrada com a avaliação da actividade da enzima AChE. De facto, a integração de resultados obtidos de avaliações de diferentes níveis de organização biológica (bioquímicos e respostas individuais) têm sido

reconhecidos como um passo importante na avaliação de efeitos ecotoxicológicos (Jensen *et al.*, 1997; Coen e Janssen, 2003).

2. Material e Métodos

2.1. Cultura dos organismos

Os organismos teste utilizados, *Eisenia andrei* (Bouché, 1992), eram provenientes de uma cultura de laboratório, mantida em condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{E}}$. O meio de cultura utilizado é constituído por uma mistura homogénea de solo (turfa), excremento de cavalo desfaunado e folhas partidas em fragmentos (este último servindo de alimento). Regularmente, é adicionada água ao meio de cultura, de modo a manter as condições de humidade ideais. As minhocas utilizadas para os testes experimentais pesavam entre 0,3 e 0,6g e apresentando clitelo desenvolvido. Estes organismos estiveram em solo LUFA 2.2. (solo de referência usado no ensaio, ver descrição em baixo) durante 24 horas, antes do teste, de forma a se aclimatarem ao solo.

2.2. Testes ecotoxicológicos

“Ensaio comportamental”

No presente estudo, *E. andrei* foi exposta ao princípio activo metomil. No decorrer do trabalho foram desenvolvidos dois testes em paralelo com objectivos distintos, de modo a (i) avaliar a resposta de evitamento a solos contaminados com metomil (ii) medir a inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em minhocas expostas a solo contaminado com concentrações definidas de metomil, sem possibilidade de fuga para o solo não contaminado, à semelhança do que acontece nos testes de evitamento. A solução mãe de metomil para a realização dos dois testes foi obtida por diluição da substância activa - metomil de 99,5% de pureza (gentilmente cedida pela empresa Makhteshim Agan®, Portugal) em água destilada.

Para avaliar a resposta de evitamento de *E. andrei* ao metomil, o procedimento seguido esteve de acordo com o protocolo padronizado (ISO, 2005). Este teste é de escolha

dual, em que se avalia a distribuição espacial dos organismos face a dois solos (contaminado e não contaminado). Assim para avaliar a capacidade de evitamento ao solo contaminado, *E. andrei* foi exposta a um conjunto de concentrações crescentes de metomil (2,19; 3,51; 5,62; 8,98; 14,4 e 23 mg Kg⁻¹). No procedimento experimental foram utilizadas caixas de plástico (425cm² de área) divididas ao meio com um cartão (3 réplicas/concentração), onde em cada um dos compartimentos foram colocadas 200g de solo de referência - LUFA 2.2 (*Agronomy Research Centre, Speyer, Alemanha*). O conteúdo em água do solo foi ajustado para 40% da sua capacidade de retenção, através da adição de água destilada, no caso do solo não contaminado. No solo contaminado o ajuste para a capacidade de retenção de água foi efectuado de modo a utilizar o volume de água como via de contaminação do solo. Assim a solução mãe foi diluída de forma a preparar soluções para cada um dos tratamentos, que contivessem no volume a água a adicionar para ajuste da humidade do solo e a concentração de pesticida a adicionar a cada tratamento. O teste teve início com a colocação de 10 organismos na linha central da caixa (zona de separação dos compartimentos). No sentido de evitar eventuais fugas dos organismos, foi aplicada película de plástico a vedar cada recipiente de teste, na qual foram efectuados pequenos orifícios, com o auxílio de uma agulha, de modo a facilitar o arejamento. A exposição dos organismos decorreu durante 48 horas, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, semelhantes às descritas para a manutenção das culturas. No final do ensaio o separador de cartão foi reintroduzido na posição marcada e os indivíduos presentes em cada compartimento (solo contaminado e solo controlo) foram contados. Os organismos que se encontravam sobre a linha separadora dos solos foram contabilizados como estando presentes em ambos os solos (0,5 organismos/solo), independentemente da sua posição relativa em cada compartimento. Os resultados foram expressos sob a forma de resposta net (do inglês: *net response*), variando entre -1 e 1 (Antunes *et al.*, 2008):

$$\text{Resposta net} = (C - T) / N$$

em que, C é o número de indivíduos no solo controlo, T é o número de indivíduos no solo contaminado (tratado) e N é o número total de indivíduos sobreviventes. Os valores positivos obtidos com a aplicação da fórmula representam evitamento do solo contaminado

por parte dos organismos, enquanto os valores neutros ou negativos representam indiferença ou preferência pelo solo contaminado, respectivamente. A análise de resultados foi efectuada segundo o proposto por Hund-Rinke e Wiechering (2001) e recomendado pelas normas ISO (2005). Assim, foi definido que as funções do solo, enquanto *habitat* funcional, ficam comprometidas quando mais de 80% dos organismos evitam significativamente o solo contaminado. Foi efectuado um teste t ($p < 0,05$) para avaliar as diferenças estatísticas significativas entre as respostas de cada concentração testada relativamente a zero, em que zero significa que não houve nem preferência nem evitamento dos organismos pelo solo tratado.

“Actividade da enzima AChE”

O segundo teste realizado teve como objectivo medir a inibição da actividade da enzima AChE, em organismos expostos a um gradiente crescente de concentrações de metomil (*vide* as mesmas consideradas para o teste de evitamento). O teste consistiu em expor organismos de *E. andrei* a solo contaminado com metomil durante o período de 48 horas. As concentrações a que *E. andrei* foi exposta foram as mesmas utilizadas para o teste de evitamento. Foram utilizadas caixas de plástico (226cm² de área) nas quais se colocaram 200g do solo de referência LUFA 2.2 (3 réplicas/concentração). Para cada tratamento a concentração de pesticida foi adicionada dissolvida no volume de água necessário para ajustar a humidade do solo a 40% da sua capacidade de retenção máxima. O teste foi iniciado com a adição de 5 organismos ao solo. Os recipientes foram cobertos com película de plástico, tal como descrito anteriormente e a exposição decorreu durante 48 horas. Após esse período os 5 organismos foram recolhidos, lavados e congelados a -80°C. Logo que possível procedeu-se à determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase bem como à quantificação da proteína total.

As 5 minhocas provenientes de cada concentração e de cada réplica, foram homogeneizadas em 4mL de tampão fosfato (0,1M e pH=7,2) e seguidamente centrifugadas durante 3 minutos, a 6000 rpm, a 4°C. Do sobrenadante foram retiradas duas aliquotas: uma para medir a actividade da enzima acetilcolinesterase e outra para quantificar a proteína. A actividade da AChE foi medida segundo o método descrito por Ellman *et al.* (1961) adaptado para microplaca por Guilhermino *et al.* (1996). O método

baseia-se na degradação da acetiltiocolina pela acção da enzima acetilcolinesterase formando acetato e tiocolina. Este último composto complexa com o ditiobisnitrobenzoato (DNTB) dando origem a um composto de cor amarela. A actividade da AChE foi medida em quadruplicado espectofotometricamente (*Labsystem Multiskan EX*) a 415nm, após um período de incubação de 10 e 15 minutos, à temperatura ambiente. A actividade da enzima foi expressa em nmol de substrato hidrolisado $\text{minuto}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína. A concentração da proteína das amostras foi determinada em triplicado com base no método descrito por Bradford (1976).

Os dados obtidos da actividade da acetilcolinesterase nos organismos expostos ao metomil foram analisados através de uma análise de variância unifactorial (ANOVA). De seguida aplicou-se um teste *Dunnnett* ($\alpha=0,05$), de modo a comparar a actividade da enzima AChE nos organismos expostos às diferentes concentrações de metomil testadas, relativamente aos do controlo.

3. Resultados

A figura 1 representa os resultados do ensaio de evitamento com *Eisenia andrei*, expressos em resposta net e os valores médios da actividade da enzima acetilcolinesterase registados nos organismos expostos à gama de concentrações de metomil testada. Relativamente aos resultados obtidos com o teste de evitamento verificou-se que *E. andrei* evitou o solo contaminado em todas as concentrações testadas. No entanto, só a partir da concentração $5,62 \text{ mg Kg}^{-1}$ ($\approx 1 \text{ Kg ha}^{-1}$) ($t=10,00$; $p=0,00$) o evitamento revelou ser significativo. Os resultados indicam também que acima desta concentração o solo se encontra comprometido em termos de *habitat* funcional para a sobrevivência de *E. andrei*, de acordo com o critério estabelecido por Hund-Rinke e Wiechering (2001) (resposta/evitamento net = 0.6). Relativamente aos resultados obtidos para a actividade da enzima acetilcolinesterase verificou-se uma inibição significativa (ANOVA: $F = 12,95$; g.l. = 8,17; $p < 0,001$) para todas as concentrações testadas, após a exposição de 48 horas ao princípio activo metomil, comparativamente ao controlo.

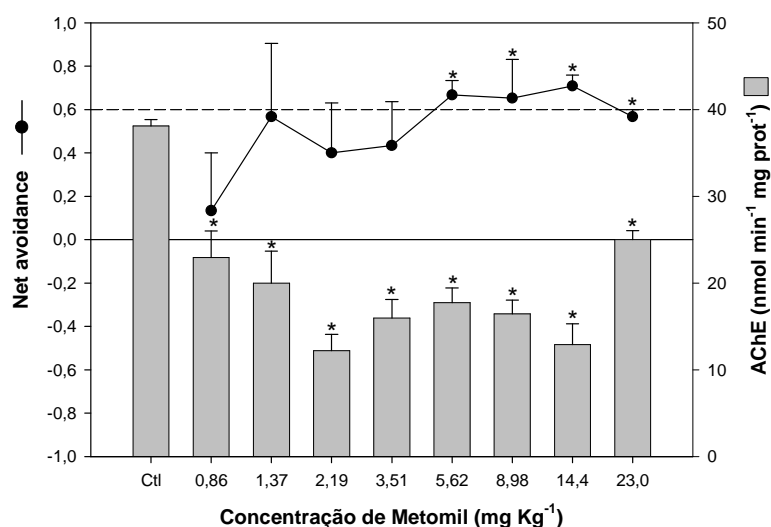


Figura 1. Representação da resposta de evitamento (linha) de *E. andrei* a solos contaminados com metomil. (*) Representam os valores estatisticamente diferentes de 0 (t-test; $P \leq 0.05$). As barras representam a actividade da enzima AChE ao longo das concentrações de metomil testadas. (*) Representam os valores estatisticamente diferentes relativamente ao controlo (Dunnet-test; $P \leq 0.05$). Em ambos os dados (resposta/evitamento net e actividade de AChE), as barras de erro indicam o erro padrão.

4. Discussão

A implementação de biomarcadores para avaliar a exposição de pesticidas requer um bom conhecimento do mecanismo de resposta (Arnaud *et al.*, 2000). As respostas dos biomarcadores são de extrema importância porque integram factores ambientais, toxicológicos e ecológicos que controlam e modelam a exposição do contaminante (Arnaud *et al.*, 2000). Os biomarcadores são ferramentas importantes num processo de análise de risco, sendo normalmente utilizados para estimar os efeitos sub-letais para vários níveis de exposição de poluentes.

A maior classe de insecticidas colinérgicos é constituída por compostos organofosforados e carbamatos que, diferem fundamentalmente no processo da inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase (Hyne e Maher, 2003). O metomil é um insecticida carbamato de contacto, sendo as principais vias de entrada no organismo a epiderme e a digestiva. Por outro lado, o metomil actua sobre a enzima acetilcolinesterase ligando-se ao seu centro activo e provocando a sua inibição (Tomlin, 2001). As minhocas

têm receptores sensoriais no prostomium e apresentam uma elevada capacidade de locomoção, tendo a possibilidade de evitar solos contaminados (Stephenson *et al.*, 1997). Contudo, os organismos, quando severamente afectados por tóxicos, podem exhibir alterações nos padrões normais de comportamento (e.g. locomoção, alimentação, escape aos predadores, actividade sexual etc.) (Rodriguez-Castellanos e Sanchez-Hernandez, 2007). Alguns estudos demonstram que as minhocas expostas a pesticidas exibem alterações na capacidade de evitamento (Slimak, 1997; Capowiez e Bérard, 2006). O evitamento, a capacidade de se enterrar no solo, ou a migração superficial requerem actividade locomotora.

De acordo com o trabalho experimental desenvolvido, tanto a inibição da enzima acetilcolinesterase como o comportamento de evitamento de *E. andrei* foram afectados pela exposição a solos contaminados com o princípio activo metomil. É reconhecido que a baixa actividade da AChE pode estar associada à falta de coordenação motora, e subsequente à dificuldade do organismo em escapar ao solo contaminado (Reinecke e Reinecke, 2007). Tal facto parece ter acontecido na concentração mais elevada de metomil testada, na medida em que associada a uma inibição significativa da actividade da enzima AChE, os organismos começaram a inverter o seu comportamento de evitamento do solo contaminado. Isto é, apesar do evitamento do solo ser significativo, a resposta net média diminuiu de forma muito consistente entre réplicas, passando a ser inferior a 0,6. Com base na resposta net registada é de considerar que o solo LUFA 2.2., contaminado com 23 mg.Kg⁻¹ de metomil, não apresenta a sua função de *habitat* comprometida (Hund-Rinke e Wiechering, 2001). Na medida em que tal possibilidade parece pouco provável, dado que houve uma resposta monotópica até à concentração 14,4 mg Kg⁻¹, os dados obtidos sugerem que a falta de coordenação neuromuscular, por diminuição da actividade da enzima AChE, desde a concentração mais baixa do metomil (0,86 mg Kg⁻¹) deve ter interferido na locomoção das minhocas e na sua capacidade para evitarem os solos contaminados. Tal como no estudo efectuado por Gambi et al. (2007), os resultados obtidos confirmam que a determinação da actividade da enzima AChE é um critério sensível usado nos testes de toxicidade com *E. andrei*, mesmo a baixas concentrações de metomil.

Estes dados carecem de confirmação, testando outros pesticidas com modos de acção diferentes, e comparando a resposta de evitamento de *Eisenia* sp. aos mesmos.

Adicionalmente a análise da actividade da enzima AChE poderá ser avaliada directamente no ensaio de evitamento, quer nos organismos que concretamente conseguiram evitar o solo contaminado, quer naqueles que nele permaneceram. Esta avaliação permitirá confirmar se de facto a alteração comportamental terá estado relacionada com a inibição da AChE, na medida em que caso esta hipótese se confirme, é de esperar que nas réplicas do ensaio dual, o nível de inibição nos organismos encontrados no solo LUFA 2.2. seja inferior ao dos organismos que permaneceram no solo contaminado, durante as 48 horas de exposição.

A análise de risco, de novos pesticidas, recomendada para autorização da sua entrada no mercado, exige uma avaliação de risco ecotoxicológica na qual são requeridos testes de toxicidade com minhocas (Directiva 91/414/EEC). Os principais critérios de avaliação para a toxicidade das minhocas são ensaios de comportamento, morte, mudanças de crescimento e reprodução. Este estudo alerta para o facto de os ensaios de evitamento com *Eisenia* sp. poderem, quando aplicados a insecticidas com modos de acção semelhantes ao metomil, mascarar os efeitos tóxicos, na medida em que a capacidade de evitamento de solos contaminados, pelos organismos pode ter sido alterada. Caso se venham a confirmar, poderá conduzir a que os testes de evitamento com *Eisenia* sp., deixem de ser recomendados para a fase de rastreio ecotoxicológico de determinados pesticidas.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem às empresas Makhteshim Agan® (Portugal), Sapec Agro® (Portugal) e Lactema (Portugal) por terem fornecido o princípio activo metomil.

Referências bibliográficas

- Antunes SC, Castro BB, Pereira R e Gonçalves F (2008). Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. *Science of the Total Environment* 390: 387-395.
- Arnaud C, Deni-Saint M, Narbonne JF, Soler P e Ribera D (2000). Influences of different standardised test methods on biochemical response in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soils Biology & Biochemistry* 32: 67-73.

- Bouché A (1992). Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ e Heimbach F (Eds.) *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept, Andover.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Capowiez Y e Bérard A (2006). Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Apporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 198-206.
- Chambers JE, Boone JS, Carr RL, Chambers HW, Straus e David L (2004). Biomarkers as Predictors in Health and Ecological Risk Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 8 (1): 165-176.
- Coen WM e Janssen CR (2003). A multivariate biomarker link: Relationships between on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1632-1641.
- Day KE e Scott IM (1990). Use of acetilcolinesterase activity to detect sub-lethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology* 18: 101-114.
- Deneer JW (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science* 56: 516-520.
- Detra RL e Collins WJ (1991). The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae (*Chironomidae: Diptera*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 1089-1095.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V e Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology* 7: 88-95.
- Gambi N, Andrea P e Fabbri E (2007). Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 145: 678-685.
- Guilhermino L, Lopes MC, Carvalho AP e Soares AMVM (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32 (4): 727-738.
- Hyne Ross V e Maher William A (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicities that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366-374.
- Hund-Rinke K e Wiechering H (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *Journal of Soils and Sediments* 1: 15-20.

- ISO 17512-1 (2005). Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals – test with earthworms (*Eisenia andrei*). Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.
- Jensen CS, Gardal L e Baatrup E (1997). Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behaviour in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1727-1732.
- Livingstone DR (1993). Review biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57: 195-211.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D e DelValls TA (2004). Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. *Trends in Analytical Chemistry* 23 (10-11): 807-818.
- Martinez- Tabche L, Estrada BM e Galar I (1992). Parathion and salinity effects on gills and mesonephros carbonic anhydrase activity of the fish *Oreochromis hornorum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 49: 929-934.
- OECD (2000). Guideline for testing of chemicals: earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*). Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris.
- Rao JV, Pavan YS e Madhavendra SS (2003). Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 296-301.
- Reinecke AJ, Maboeta MS, Vermeulen LA e Reinecke SA (2002). Assessment of lead and Mancozeb toxicity in earthworm using the avoidance response. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 779-786.
- Reinecke SA e Reinecke AJ (2007). The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology of Environmental Safety* 66: 244-251.
- Rodriguez- Castellanos L e Sanchez-Hernandez CJ (2007). Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal Pesticide Science* 32 (4): 360-371.
- Slimak KM (1997). Avoidance response as a sub-lethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biology Biochemistry* 29: 713-715.
- Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T e Scroggins RP (1997). Use of an avoidance- response test to assess toxicity of contaminated soils to earthworm. In: Advances in Earthworm Ecotoxicology. Editado por Sheppard SC, Bembridge JD, Holmstrup M e Posthuma L., SETAC, Pensacola.

- Thompson MC e Richardson RJ (2004). Anticholinesterase Insecticides. In: Marrs TC e Ballantyne B. Pesticide Toxicology and international regulation. Editado por John Wiley and Sons. Edenbridge, UK.
- Tomlin AD (1992). Behaviour as a source of earthworm susceptibility to ecotoxicants. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F (Eds). Ecotoxicology of Earthworms. Intercep, Andover.
- Tomlin CDS (2001). Methomyl In: The pesticide manual. British Crop Protection Council, Surrey.
- Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ e Hermens JLM (1992). Classifying environmental-pollutants. I. Structure-activity-relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25: 471-491.
- Zinkl JG, Lockart WL, Kenny SA e Ward FJ (1991). The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Cholinesterase- Inhibiting Insecticides: Their impact on Wildlife and the Environment. Editado por Mineau P. *Elsevier*, Amsterdam.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Actualmente os problemas ambientais são múltiplos e complexos, sendo que um deles passa pela identificação e avaliação da toxicidade dos inúmeros pesticidas, produzidos e comercializados, em espécies não alvo, de forma a ser possível inferir sobre o seu impacto nos ecossistemas. A aplicação destes químicos na agricultura, de forma deliberada e em larga escala, contamina directa ou indirectamente os meios terrestres e aquáticos o que suscita uma grande preocupação científica em relação às espécies existentes nestes ecossistemas.

A magnitude do potencial risco dos pesticidas impulsionou a legislação europeia no sentido de exigir uma avaliação de risco preditiva, englobando informação relativa à persistência, mobilidade e destino destes compostos, nos diferentes compartimentos ambientais, em paralelo com informação ecotoxicológica. Contudo, e no que concerne a este tipo de informação, o cálculo dos riscos só é possível se esta informação estiver disponível em quantidade e qualidade considerável. Relativamente aos princípios activos propanil, glifosato e metomil, constituintes de pesticidas de vasta utilização em Portugal e na Europa, a informação ecotoxicológica disponível, para espécies não alvo, com um papel chave nas cadeias tróficas aquáticas e terrestres, era escassa. De forma a contribuir para colmatar esta lacuna, foram realizados, neste trabalho, testes laboratoriais com espécies padronizadas (*Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Eisenia andrei*) para avaliar a sua toxicidade aguda e sub-letal.

De entre as espécies aquáticas expostas ao propanil os resultados mostram que a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* apresentou maior sensibilidade a este químico ($CE_{50}=0,031\text{mg L}^{-1}$) quando comparada com *Daphnia magna* ($CE_{50}=2,1\text{mg L}^{-1}$). Contudo, em relação ao outro herbicida (glifosato) foram testadas gamas de concentração até 2000mg L^{-1} e não se obtiveram indícios de toxicidade. No caso do insecticida (metomil), e tal como era esperado, *Daphnia magna* é muito mais sensível ($CE_{50}=0,021\text{mg L}^{-1}$) do que *Pseudokirchneriella subcapitata* ($CE_{50}=2,1\text{mg L}^{-1}$). Os resultados obtidos para a espécie representativa do compartimento terrestre mostram que *Eisenia andrei* apresentou um evitamento significativo apenas no caso do insecticida metomil a partir da concentração de $5,62\text{mg Kg}^{-1}$ (Teste $t=10$; $p=0$).

Sabendo que a actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que tem um papel fundamental na transmissão de impulsos nervosos e na coordenação neuromuscular, é inibida por pesticidas carbamatos e organofosfatos, levantou-se a hipótese de esta causar alterações na coordenação motora dos organismos, alterando o seu comportamento. Assim, na segunda parte experimental do presente trabalho, este biomarcador foi utilizado para avaliar se a sua inibição poderá ou não estar a comprometer a resposta evitamento de *Eisenia* sp., quando exposta a solos contaminados com o princípio activo metomil. Pelos resultados observou-se que em toda a gama de concentrações testadas (2,19 a 23mg Kg⁻¹) houve uma inibição significativa da enzima AChE ($p \leq 0,05$). Pode considerar-se que existe uma forte possibilidade da resposta comportamental de *Eisenia andrei*, quando exposta ao metomil, ser afectada pela inibição da enzima AChE. Este aspecto foi reforçado pelo facto de os organismos mostrarem uma tendência para inverterem a sua capacidade de evitamento do solo, quando contaminado com a concentração mais elevada do pesticida. Neste sentido, avaliações adicionais são necessárias, com outros pesticidas e com outros organismos teste, na medida em que está em causa a validade do ensaio de evitamento padronizado, no rastreio de pesticidas do grupo dos carbamatos ou dos compostos organofosforados.

As Directivas Europeias 93/67/CEE (CE, 1993), 1488/94 (CE, 1994) e o Regulamento 98/8/CEE (CE, 1998) requerem que seja efectuada uma avaliação de risco ecológico para as novas substâncias químicas desenvolvidas, antes de estas serem colocados no mercado, bem como para princípios activos de pesticidas já em circulação no mercado, com intuito de banir aqueles que demonstram ser tóxicos para organismos não alvos. O facto desta recomendação se restringir apenas aos princípios activos já existentes pode ser uma lacuna dado que alguns excipientes adicionados, ao princípio activo podem tornar o produto mais tóxico. Deste modo, será de todo interessante e imprescindível que se iniciem em paralelo avaliações ecotoxicológicas das substâncias comerciais novas e existentes no mercado, para que, caso se justifique, a legislação inicie um processo de obrigatoriedade para a avaliação de riscos dos produtos formulados antes e após terem sido colocados no mercado, pois na realidade são estes que são aplicados nos ecossistemas terrestre e aquático.

O facto de a legislação impulsionar a realização de testes ecotoxicológicos para espécies não alvo antes do princípio activo ser lançado para o mercado, é uma forma de

perspectivar ou antever os efeitos que estes químicos podem causar no meio ambiente. Urge a necessidade de aumentar e intensificar cada vez mais estudos ecotoxicológicos integrando o maior número de espécies possível e respectivas sensibilidades, de modo a determinar doses limiares de aplicação mais protectoras. Este trabalho deve ocorrer em paralelo com o desenvolvimento de compostos químicos com elevada taxa de degradação no ambiente. Adicionalmente as doses testadas neste trabalho (doses agudas) não têm grande relevância ecológica, dado que não correspondem às concentrações que se prevêem que ocorram no ambiente, caso as taxas de aplicação sejam respeitadas. Assim os resultados obtidos devem ser complementados com ensaios sub-letais e ensaios *in situ*, acompanhados de programas de monitorização química, integrando o maior número de espécies possível, assim como a avaliação de parâmetros sub-individuais, individuais e ao nível da comunidade.

É premente integrar dados de respostas comportamentais e fisiológicas para confirmar a provável ligação mecanísticas entre elas. De facto, a integração de diferentes níveis de organização (bioquímicos e respostas individuais) tem sido reconhecida como um passo fundamental avaliação da relevância ecológica dos biomarcadores moleculares, tal como a AChE. Pela parte experimental efectuada na segunda parte do trabalho, os resultados mostram que a determinação da actividade da AChE é um critério sensível usado nos testes de toxicidade com *Eisenia andrei*, mesmo a baixas concentrações de metomil, podendo o mesmo ter implicações a nível da resposta individual e subsequentemente da população, na medida em que a redução da capacidade de evitar um solo contaminado, pode por em causa a sustentabilidade da população